

**ANA ROSA POMBO BOTELHO**

**CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO MOLECULARES DE *MYCOPLASMA*  
*MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC, AGENTE ETIOLÓGICO DA  
PERIPNEUMONIA CONTAGIOSA BOVINA**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor em Biologia -  
Especialidade Biologia Molecular pela  
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.  
A presente dissertação foi preparada no Departamento de Bacteriologia do  
Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

**LISBOA**

**2001**

*Aos meus filhos*  
*Pedro e Maria Ana*

*Two roads diverged in a wood, and I-  
I took the one less travelled by,  
And that has made all the difference.*

Robert Frost, 1920. "The road not taken"

## **AGRADECIMENTOS**

A efectivação desta tese de doutoramento constituiu uma caminhada longa e atribulada, desde a finalização da licenciatura em 1978. Com um atraso de 20 anos deixou de ser um sonho e passou a uma obrigação, que talvez não seja a melhor motivação para levar a efeito um trabalho deste tipo. Nunca mais me esqueci da frase inscrita no gabinete do meu orientador de então, Prof. Doutor J. Pinto-Lopes. Por isso a escolhi como epígrafe. O ciclo completou-se por caminhos pouco percorridos. Para que tal acontecesse houve o apoio, directo ou indirecto, de várias pessoas a quem devo e quero agradecer:

Ao Professor Doutor Joachim Frey por me ter proporcionado uma estadia no seu laboratório do Institute for Veterinary Bacteriology, Berna, em Novembro de 1996, e por ter aceite a orientação à distância deste projecto, cedendo material e informações indispensáveis à realização do trabalho experimental.

À Professora Doutora Isabel Spencer Martins, coordenadora da Secção Autónoma de Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, por pronta e incondicionalmente ter aceite a co-orientação deste trabalho, sendo a sua patrocinadora ao tornar possível a sua concretização, e pelo empenho e zelo com que reviu e corrigiu o manuscrito.

Ao Professor Doutor A. Penha-Gonçalves que, apesar de Jubilado, continuou a ser meu orientador no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), por se preocupar comigo e me lembrar que podia sempre contar com ele.

Ao Dr. Regalla, chefe do Departamento de Bacteriologia do LNIV, por me ter apresentado à PPCB e ao seu famoso agente etiológico e dado “carta branca” para o tentar conhecer melhor.

Ao Dr. Alexandre Galo, Director do LNIV, pela confiança que em mim depositou e por ter propiciado a realização e conclusão deste trabalho na Instituição que dirige.

Ao Doutor Edy Vilei, do Institute for Veterinary Bacteriology da Universidade de Berna, pelo seu interesse e sugestões relativamente à parte experimental do trabalho dos Capítulos 3 e 4 e pela sua contribuição na sequenciação e ordenação das sequências de DNA.



A Ms. Yvonne Schlatter, do Institute for Veterinary Bacteriology da Universidade de Berna, pela eficiente assistência técnica na sequenciação de DNA.

Às duas Margaridas da minha vida:

À Margarida Duarte (primeira “cascavel” doutora) por me ter “adoptado” na parte final do trabalho, sendo a minha massa crítica exigente e rigorosa mas sempre com uma palavra de ânimo, e por me ter guiado nos caminhos da bioinformática (Uffa!!).

À Margarida Guerreiro (minha alma quase-gêmea que em vão tento imitar), por continuar a ser a pessoa a quem sempre recorro quando me vejo em apuros e pelos seus “ralhetes” bem merecidos.

À Dr<sup>a</sup> Isabel Marques (a santa), da Unidade de Bioinformática do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, por ter facilitado o acesso ao Portuguese EMBnet e por estar sempre pronta a dar esclarecimentos relativos às ferramentas de análise bioinformática.

Ao Dr. Hamilton Ferreira, do Serviço de Produção de Imunogénios do LNIV, por me ter iniciado na imunização de coelhos e ajudado com a sua perícia e experiência.

Aos colegas do Departamento de Virologia – Diagnóstico Viroológico e Serologia por me fazerem sentir que não estava só nos meandros da Biologia Molecular ao disponibilizarem material, equipamento e protocolos.

À Dr.<sup>a</sup> Elisabeth Brandão (Beta) por ter partilhado comigo o “seu” computador e me ter dado guarida num local sossegado para a escrita desta dissertação.

Ao Professor Doutor Karl-Erik Johansson (Kaggen) por me ter recebido, em Fevereiro de 2000, no seu laboratório de FöU (Research & Development) do Departamento de Bacteriologia do Nacional Veterinary Institute, Uppsala, e a toda a sua equipa que me fez sentir em casa.

A Anja Persson e Malin Heldetehnder por terem tornado essa estadia num reencontro de amigos e ensinado os vários truques da sequenciação com o “Alfy”.

À Celina Botelho, que para além de uma óptima profissional é também minha irmã, pela execução gráfica das figuras e pela disponibilidade total mesmo a horas impróprias e com crianças ensonadas pelo meio.

Ao Virgílio pela sua inesgotável paciência e compreensão, nas minhas investidas de mau humor, e por nunca ter levado a sério as inúmeras ameaças de desistência.

Ao Pedro e à Maria Ana por terem suportado as minhas ausências e a falta de disponibilidade para os atender.

Ao meu Pai e à memória de minha Mãe por terem estado sempre presentes e velarem por mim em todos os momentos.

Às minhas amigas, companheiras de tantos almoços, por me terem ajudado a superar as crises e outras “coisas da vida” com a nossa catarse semanal.

A todos aqueles que me perguntaram tantas vezes: “Quando é que essa tese está pronta?”.

Essa tese aqui está. FINALMENTE!!!

## SUMÁRIO

O trabalho realizado incidiu sobre estudos moleculares de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, agente etiológico da Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB), como base para o desenvolvimento de aplicações relacionadas com o diagnóstico desta doença e com a sua patogenicidade.

Devido ao grande impacto sócio-económico, a PPCB é considerada pelo “*Office International des Epizooties*” uma doença grave pertencente ao grupo A e requerendo, como tal, medidas de controlo internacional especiais e rigorosas. Apesar de nos últimos 10 anos se ter registado na Europa, e particularmente em Portugal, uma redução dos surtos de PPCB, medidas de vigilância apertadas devem ser mantidas de modo a poder considerar-se a doença efectivamente erradicada deste continente. Em contrapartida, em África a PPCB ainda é endémica e continua a alastrar-se. É, portanto, evidente a necessidade de desenvolver novos e melhorados testes de diagnóstico que permitam a identificação específica e sensível de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, de modo a determinar as fontes, reservatórios e vias de infecção e a compreender os mecanismos de patogenicidade.

Neste trabalho, a primeira abordagem do problema consistiu no estudo epidemiológico de surtos de PPCB ocorridos no Norte de Portugal entre 1993 e 1998. Um total de 105 isolados de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC foram tipificados com o elemento de inserção IS1296. Foram observados três padrões. O padrão E1, comum à maioria das estirpes e já referido como característico de estirpes europeias (Cheng *et al.*, 1995), não permitiu a detecção de fontes e vias de infecção. Duas das estirpes analisadas evidenciaram, contudo, dois padrões diferentes, E2 (estirpe B676P/93) e E3 (estirpe 6092), o primeiro com uma banda adicional de cerca de 6 kb e o segundo sem uma banda de cerca de 10 kb. Estas bandas parecem corresponder a uma adição e deleção, respectivamente, de uma cópia do elemento IS1296.

Na segunda parte deste estudo, foram desenvolvidos dois métodos baseados em PCR e dois tipos de *immunoblotting* para a diferenciação de estirpes africanas e europeias de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, com o objectivo de poder vir a controlar a eventual introdução na Europa de estirpes africanas mais virulentas. Utilizando iniciadores correspondentes a regiões adjacentes a uma cópia do elemento de inserção IS1296, a reacção de PCR amplificou um fragmento de DNA de 9,3 kb nas estirpes africanas e um fragmento de 450 pb nas europeias, devido à deleção de uma região genómica de 8,5 kb nestas últimas estirpes (Vilei *et al.*, 2000). Foram analisadas 98 estirpes, incluindo a estirpe tipo PG1, 84 estirpes europeias, entre as quais 80 isoladas em Portugal, e 14 estirpes africanas. Todas elas apresentaram o fragmento amplificado

esperado. A região N-terminal da lipoproteína LppB, codificada pelo gene *lppB* identificado no fragmento de 8,5 kb das estirpes africanas, foi expressa e a proteína de fusão heteróloga LppB-His de 38,2 kDa utilizada para: i) indução de anticorpos policlonais monospecíficos em coelho, a usar na identificação de estirpes africanas por *immunoblotting*, e ii) detecção de focos de PPCB, por *immunoblotting* com soro de bovinos infectados com estirpes africanas.

Na continuação do resultado singular obtido para a estirpe B676P/93, relativamente aos polimorfismos do elemento de inserção IS1296, procedeu-se à sequenciação e caracterização de um fragmento de DNA de 5,6 kb desta estirpe que hibridou com uma sonda baseada neste elemento. Foram identificadas duas ORFs (ORF1L114 e ORR2R114) e as correspondentes lipoproteínas putativas caracterizadas estrutural e funcionalmente *in silico*. O elemento de inserção IS1634, anteriormente descrito por Vilei *et al.* (1999), foi também identificado e apresentou a estrutura geral já conhecida de outras cópias, incluindo um gene correspondente a uma transposase e repetições longas directas de 115 pb. A segunda ORF, parcialmente sequenciada, está localizada a jusante do elemento IS1634. A ORF1L114 deverá ser avaliada quanto à possibilidade de ser utilizada para a produção de vacinas ou diagnóstico de surtos de PPCB.

Na última abordagem desenvolvida neste trabalho, foi apreciado o significado taxonómico de um novo método de tipificação baseado na análise de perfis electroforéticos de tRNA a partir da população celular de RNA de baixo peso molecular (LMW-RNA). As condições experimentais foram optimizadas e normalizadas, de modo a obter padrões distintos que permitiram a diferenciação e caracterização de cinco espécies e sub-espécies das seis pertencentes ao grupo "*Mycoplasma mycoides*", incluindo a separação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (*Small Colony*) de *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (*Large Colony*), este último indiferenciável de *M. mycoides* subsp. *capri*. Todas as 31 estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC apresentaram o padrão de tRNA comum a esta subespécie, com a excepção de uma micro-heterogeneidade na estirpe B820/135. Novas perspectivas emergiram destes resultados, nomeadamente o isolamento de uma espécie de tRNA observada apenas em *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e em *M. mycoides* subsp. *capri*, a qual poderá servir de base para o desenvolvimento futuro de sondas específicas ou testes de PCR. Foi a primeira vez que este método de taxonomia molecular foi aplicado na identificação e caracterização de membros do género *Mycoplasma*.

## SUMMARY

The work presented here consisted of basic molecular genetic studies of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, the etiological agent of Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP), aiming at the development of methods for its characterisation and detection.

In view of its high socio-economic impact, CBPP is declared by the "Office International des Epizooties" as a serious animal disease requiring special international control measures. The re-emerging outbreaks of CBPP in different European countries for the last 20 years revealed the insidiousness of the disease. Despite the recent decline of CBPP outbreaks in Europe, namely in Portugal since 1993, surveillance of the disease is still requested to maintain Europe free of CBPP in the future. On the other hand, CBPP is still endemic in Africa and there is a continuous and alarming spread of the disease. Molecular epidemiological studies have shown, however, that the endemic strains of *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC in Africa are different from those found in Europe at the end of the last century. Therefore, specific and sensitive diagnostic tests and methods for strain identification are requested to establish the sources and reservoirs of infections and to understand the mechanisms of pathogenicity.

To address this problem, an epidemiological study of CBPP outbreaks occurring in Northern Portugal between 1993 and 1998 was carried out. One hundred and five *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates collected during this period were fingerprinted with the insertion element IS1296 (Cheng *et al.*, 1995). This analysis revealed that most of the strains isolated, except two, showed the IS1296 pattern E1, which is characteristic for European strains. No isolates resembling African strains were detected. This indicated that all outbreaks must have had their origin in Europe, from a common source that contaminated also other European countries that suffered from CBPP. Two strains, B676P/93 and 6092, showed particular IS1296 patterns, E2 and E3 respectively, eventually derived from the common European type E1. Strain B676P/93 showed an additional copy of IS1296 and strain 6092 appeared to have lost a copy of this element, as compared to pattern E1. Future studies should investigate the performance of these isolates and their capability to multiply, both *in vitro* and *in vivo*, and to induce immunological response and produce infection.

The second approach comprised the development of a PCR-based method and immunoblotting for the differentiation of European and African *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC strains, with the objective of monitoring the possible introduction in Europe of highly virulent African strains. The same pair of primers led to the amplification of a 9.3 kb DNA fragment with African strains and a 450 bp fragment with European strains, the latter resulting from a specific 8.5 kb deletion (Vilei *et al.*, 2000). This method was

applied to the analysis of 98 strains, including the PG1 type strain, 84 European strains, among which 80 were isolated in Portugal, and 14 African strains. The N-terminal portion of lipoprotein LppB, encoded by the *lppB* gene in the 8.5 kb fragment of African strains, was cloned and expressed as a poly-histidine tailed fusion protein LppB-His which was used: i) for the induction of rabbit polyclonal monospecific serum, applied to the identification of African strains by immunoblotting, and ii) for immunoblot diagnosis of CBPP, caused by infection with African strains, in bovine sera.

A 5,6 kb DNA fragment from strain B676P/93 was sequenced. The corresponding fragment revealed two open reading frames (ORF1L114 and ORF2R114) encoding putative lipoproteins that were structurally and functionally characterised *in silico*. The fragment also contained an insertion element IS1634 (Vilei *et al.*, 1999) which was flanked by 115 bp direct repeats. ORF2R114 was identified downstream the IS1634 element and was partially sequenced. Future work should focus on the cloning and expression of the genes encoded by ORF1L114 with the aim to produce vaccines or specific diagnostic tools for CBPP.

In the last part of this work, a new taxonomic method allowing genetic typing of *Mycoplasma* species belonging to the "*Mycoplasma mycoides* cluster" is presented. This method is based on the analysis of tRNA profiles obtained by high resolution denaturing gel electrophoresis of the low molecular weight (LMW)-RNA cell pool. Experimental conditions were optimised and standardised in order to obtain easily identified distinct patterns. Five species and subspecies among the six recognised within the "*Mycoplasma mycoides* cluster" were differentiated. The method allowed the separation of *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC from *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC and *M. mycoides* subsp. *capri*, but the latter two were indistinguishable confirming that they represent the same subspecies. All the 31 *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC strains presented the tRNA pattern of this subspecies, with only a minor-heterogeneity in strain B820/135. New perspectives arose from these results, mainly the isolation of the tRNA species observed only in *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC and *M. mycoides* subsp. *capri*, which might be used for future development of specific probes or PCR tests. It was the first time that this molecular method was applied to the identification of species in the genus *Mycoplasma*.

## ABREVIATURAS

A <sub>260</sub>	absorvência ao comprimento de onda indicado
ATP	trifosfato de adenosina
APS	persulfato de amónio (do inglês, <i>Ammonium Persulphate</i> )
BrEt	brometo de etídio
BSA	albumina sérica de bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CIAP	fosfatase alcalina (do inglês, <i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> )
DEPC	dietilpirocarbonato
DIG	digoxigenina
DMF	dimetil formamida
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleótido
DO <sub>600</sub>	densidade óptica ao comprimento de onda indicado
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>g</i>	aceleração da gravidade
G+C	teor em guanina e citosina
GCG	<i>Genetics Computer Group</i>
GES	tampão de guanidina tiocianato
IPTG	isopropil-1- <i>tio</i> -β-galactósido
IS	sequência de inserção (do inglês, <i>Insertion Sequence</i> )
Ig	imunoglobulina
kDa	10 <sup>3</sup> Dalton
kb	10 <sup>3</sup> pares de bases
LB	meio de cultura Luria-Bertani (1% bacto triptona, 0,05% extracto de levedura, 1%) NaCl
LC	biótipo colónias grandes (do inglês, <i>Large Colony</i> )
LMW RNA	peso molecular baixo (do inglês, <i>Low Molecular Weight</i> )
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
MCS	local de clonagem múltipla (do inglês, <i>Multiple Cloning Site</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	nucleótidos
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
ORF	grelha de leitura aberta (do inglês, <i>Open Reading Frame</i> )

PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida (do inglês, <i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> )
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato 0,01 M, NaCl 0,9%, pH 7,4
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFC	prova de fixação do complemento
PFGE	electroforese em campo pulsado (do Inglês, <i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> )
pBS SK(-)	plasmídeo pBluescript II SK(-)
PIPES	<i>piperazine-N, N'-bis (2-ethane-sulfonic acid)</i>
PPCB	Peripneumonia Contagiosa Bovina
PPCC	Pleuropneumonia Contagiosa Caprina
RFLP	polimorfismos de restrição (do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polimorphisms</i> )
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA de transferência
rpm	rotações por minuto
SC	biótipo colônias pequenas (do Inglês, <i>Small Colony</i> )
SDS	dodecilsulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SSC	tampão de sódio e citrato [(20X: 3 M NaCl, 0,3 M citrato trisódico dihidratado, pH7,0 com 1M HCl)] (do inglês, <i>Standard Saline Citrate</i> )
TAE	tampão Tris-ácido acético [(1X: 40 mM Tris acetato, 2 mM EDTA, pH 8,5)]
TBE	tampão Tris borato [(89 mM Tris/HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3)]
TE	tampão Tris EDTA [(10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5)]
TEMED	N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

#### Abreviaturas de gêneros de microrganismos

<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<i>S.</i>	<i>Spiroplasma</i>
<i>U.</i>	<i>Ureaplasma</i>



## ÍNDICE

SUMÁRIO	ix
SUMMARY	xi
ABREVIATURAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABELAS	xxiii
PREFÁCIO	xxv
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
1.1- TAXONOMIA E ECOLOGIA DO GÉNERO <i>MYCOPLASMA</i>	1
1.2- <i>MYCOPLASMA MYCOIDES</i> SUBSP. <i>MYCOIDES</i> SC	5
<i>Proteínas Imunogénicas</i>	6
<i>RNAs de Transferência</i>	8
<i>Deteção e identificação</i>	8
<i>Métodos baseados em PCR</i>	10
<i>Epidemiologia molecular</i>	11
<i>Sequências de inserção</i>	13
1.3- PERIPNEUMONIA CONTAGIOSA BOVINA (PPCB)	16
1.4- OBJECTIVOS DO PRESENTE TRABALHO	21
<b>2. TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS PORTUGUESES DE <i>MYCOPLASMA MYCOIDES</i> SUBSP. <i>MYCOIDES</i> SC COM BASE NO ELEMENTO DE INSERÇÃO IS1296</b>	<b>23</b>
2.1 - INTRODUÇÃO	23
2.2- MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.2.1- Estirpes analisadas e condições de cultura	27
2.2.2- Preparação de DNA genómico de micoplasmas	28
2.2.3- Digestão de DNA genómico com a endonuclease <i>HindIII</i>	30
2.2.4- Preparação de sonda de DNA - IS1296 - marcada com digoxigenina.	30
2.2.5- Hibridação por <i>Southern blotting</i>	30
2.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
<b>3. DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E ANTIGÉNICA ENTRE ESTIRPES DE ORIGEM EUROPEIA E AFRICANA DE <i>MYCOPLASMA MYCOIDES</i> SUBSP. <i>MYCOIDES</i> SC</b>	<b>37</b>
3.1- INTRODUÇÃO	37
3.2- MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.2.1- Estirpes analisadas e condições de cultura	42
3.2.2- Preparação de DNA genómico para hibridação <i>Southern-blot</i>	44
3.2.3- Preparação de DNA genómico para PCR	46
3.2.4- Amplificação de DNA genómico por PCR	46
3.2.5- Expressão da região N-terminal da proteína LppB	47
3.2.6- Purificação da região N-terminal da proteína LppB	52
3.2.7- Produção de antígenos	52
3.2.8- Produção de anticorpos policlonais monospecíficos em coelhos	53

3.2.9- Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	53
3.2.10- Transferência de proteínas e imunomarcação ( <i>Western-blot</i> )	55
3.3- RESULTADOS	55
3.3.1- Diferenciação entre estirpes europeias e africanas por PCR	55
3.3.2- Detecção de estirpes africanas	57
3.3.3- Expressão e purificação da proteína heteróloga LppB-His	58
3.3.4- Presença da proteína LppB em estirpes de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	58
3.3.5- Especificidade serológica	61
3.4- DISCUSSÃO	62
 <b>4. CARACTERIZAÇÃO DE UMA REGIÃO GENÓMICA ASSOCIADA A ELEMENTOS DE INSERÇÃO DA ESTIRPE PORTUGUESA <i>MYCOPLASMA MYCOIDES</i> SUBSP. <i>MYCOIDES</i> SC B676P/93</b>	 <b>67</b>
4.1- INTRODUÇÃO	69
4.2- MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.2.1- Estirpes bacterianas	70
4.2.2 – Construção da biblioteca genómica	70
<i>Preparação de células competentes de E. coli</i>	70
<i>Transformação de células competentes</i>	71
<i>Seleção de transformantes</i>	71
4.2.3- Preparação de DNA genómico de micoplasmas	72
4.2.4- Extração de DNA plasmídico para sequenciação	72
4.2.5- Digestão de DNA com enzimas de restrição	72
4.2.6– Clonagem e subclonagem	73
<i>Clonagem de fragmentos de restrição purificados a partir de gel de agarose</i>	75
<i>Subclonagem direccionada por execução de deleções (método de Henikoff, 1984)</i>	74
4.2.7– Imobilização de DNA e hibridação em suporte sólido com sondas não-radioactivas	75
<i>Transferência in situ de DNA de células bacterianas</i>	75
<i>Transferência de DNA de gel de agarose para membrana de nylon - Southern blotting</i>	76
<i>Preparação de sondas de DNA marcadas com digoxigenina</i>	77
<i>Hibridação com as sondas marcadas</i>	78
4.2.8- Seleção de recombinantes plasmídicos	79
4.2.9– Sequenciação de DNA	80
4.2.10– Análise <i>in silico</i>	83
4.3– RESULTADOS	84
4.3.1- Biblioteca genómica da estirpe B676P/93	84
4.3.2– Seleção de clones recombinantes com a sequência IS1296	84
4.3.3 – Estratégias de sequenciação	86
4.3.4 – Análise da sequência nucleotídica do fragmento de DNA inserido em pBSIS114	88
<i>Comparação com outras sequências nucleotídicas</i>	88
<i>Análise comparativa da sequência de inserção IS1634</i>	94
<i>Análise das sequências polipeptídicas inferidas</i>	98
4.4 - DISCUSSÃO	100
 <b>5- DIFERENCIAÇÃO DOS MEMBROS DO GRUPO “<i>MYCOPLASMA MYCOIDES</i>” ATRAVÉS DOS PERFIS DE RNA DE BAIXO PESO MOLECULAR</b>	 <b>109</b>

5.1- INTRODUÇÃO	109
5.2- MATERIAIS E MÉTODOS	112
5.2.1-Extracção de RNA de baixo peso molecular (LMW-RNA)	113
5.2.2- Electroforese de LMW-RNA em gel de poliacrilamida	115
5.3- RESULTADOS	117
5.3.1- Preparação e separação de LMW-RNA	117
<i>Purificação de RNA</i>	117
<i>Electroforese de tRNA em gel de poliacrilamida: condições A</i>	118
<i>Electroforese de tRNA em gel de poliacrilamida: condições B e C.</i>	120
5.3.2- Caracterização dos membros do grupo “ <i>Mycoplasma mycoides</i> ” por análise do perfil de tRNAs	121
5.3.3- Variação intraspecífica dos perfis de tRNA	124
5.4- DISCUSSÃO	124
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>135</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.1-** Cronologia da evolução da PPCB no Mundo desde o séc. XVIII até fins do séc. XX. 17
- FIGURA 1.2- A-** Classificação das diferentes zonas geográficas de Portugal de acordo com a incidência de focos de PPCB em 1999; **B-** Prevalência da PPCB em Portugal na região infectada, área de focos (Entre Douro e Minho e Beira Litoral). 19
- FIGURA 1.3-** Incidência de focos de PPCB em Portugal entre 1986 e 2000 e, em particular, nas regiões de Entre Douro e Minho e Beira Litoral. 19
- FIGURA 2.1-** Origem geográfica e respectiva distribuição numérica das estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC usadas neste estudo, isoladas de surtos de PPCB ocorridos em Portugal entre 1993 e 1998. 38
- FIGURA 2.2-** Resultado da hibridação entre a sonda IS1296 marcada com digoxigenina e os fragmentos resultantes da hidrólise com *Hind*III do DNA genómico das estirpes europeias L2 e B676P/93 e da estirpe africana Afadé. 33
- FIGURA 2.3-** Resultado da hibridação entre a sonda IS1296 marcada com digoxigenina e os fragmentos resultantes da hidrólise com *Hind*III do DNA genómico das estirpes indicadas. 33
- FIGURA 3.1-** Mapa genético da região do genoma de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC que contém o gene *lppB*. Esta região diferencia as estirpes europeias (representadas pela estirpe L2), das estirpes africanas (representadas pela estirpe Afadé). 43
- FIGURA 3.2-** Representação esquemática do vector pETHIS-1, com os seus elementos reguladores mais importantes (promotor T7 e terminador T7) e genes inscritos. 48
- FIGURA 3.3-** Representação esquemática do controlo da expressão da proteína de fusão recombinante LppB-His na célula hospedeira de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pJFFLppB-His. 49
- FIGURA 3.4-** Esquema do processo de expressão e purificação da proteína de fusão Lpp- His. 51
- FIGURA 3.5-** Análise, em electroforese de gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação por PCR com os iniciadores 7500BP1L e 3480BP-R em condições standard, a partir do DNA da estirpe europeia B675 e das estirpes africanas Fatick e Gemu Goffa. 56
- FIGURA 3.6-** Avaliação do método de PCR para detecção específica de estirpes europeias de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. 56
- FIGURA 3.7-** Resultados representativos da separação por electroforese em gel de agarose a 0,6% dos produtos de amplificação por PCR com os iniciadores 7500BP1-L e 3480BP-R, em condições específicas para amplificação de fragmentos longos (2 mM MgCl<sub>2</sub>), a partir do DNA das estirpes indicadas. 57
- FIGURA 3.8-** Análise em SDS-PAGE a 12,5% das amostras recolhidas ao longo do processo de expressão em *E. coli* do péptido recombinante LppB-His, com peso molecular de 38 kDa. A- expressão em pequena escala; B- expressão em larga escala. 59

- FIGURA 3.9-** Análise em SDS-PAGE a 12,5% de fracções eluídas da coluna de Ni-NTA no processo de purificação do péptido LppB-His. 60
- FIGURA 3.10-** Expressão da proteína LppB em estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Análise de *immunoblotting* realizada com 10 µg de antígeno total, separado em SDS-PAGE de gradiente 5-15% da estirpe europeia L2 (A) e das estirpes africanas T1/44 (B), KH3J (C), 9411I (D), 87137-9 (E), 2162 (F) e Filfil (G), transferido para membrana de nitrocelulose e testado com soro monoespecífico policlonal de coelho anti-LppB-His. 60
- FIGURA 3.11-** Especificidade de soros hiperimunes de coelho e de soros de bovinos relativamente à proteína de fusão LppB-His. Após purificação de LppB-His colocou-se 2 µg em SDS-PAGE a 12,5% e, após transferência para nitrocelulose, imunomarcou-se com: soros hiperimunes de coelho anti-LppB-His (A), anti-estirpe Afadé (B) e anti-estirpe B103 (C); soro de bovino Europeu infectado com PPCB (D); soros de bovinos infectados experimentalmente com estirpe africana Afadé (E) e estirpe europeia L2 (F). xv
- FIGURA 4.1-** Análise electroforética de clones do banco de transformantes deletados, obtidos a partir do recombinante pBS114 por hidrólise com *Bss*HIII dos respectivos DNAs. 75
- FIGURA 4.2-** Resultado da hibridação de colónias de transformantes, transferidas para membrana de nitrocelulose, com sonda COLH35 marcada com digoxigenina e preparada a partir da sequência IS1296. 76
- FIGURA 4.3-** Representação esquemática do processo de selecção de clones com um fragmento inserido com uma dimensão entre 5 a 6 kb e contendo o elemento IS1296. 82
- FIGURA 4.4-** A- Selecção de clones recombinantes por hibridação *dot-blot* com a sonda IS12961L-R marcada com digoxigenina. O clone pBSISA303 possuindo um inserto de 6,5 kb com o elemento IS1296, foi utilizado como controlo positivo. B- Amplificação, por PCR com o par de iniciadores T3/T7, das sequências clonadas nos DNA plasmídicos seleccionados. 85
- FIGURA 4.5-** A- Análise da hidrólise com a endonuclease *Hind*III dos clones seleccionados por hibridação *in situ* entre a sonda COLH35, e colónias de recombinantes, por hibridação do DNA plasmídico das mesmas colónias com a sonda IS1296P1L-R e por PCR com os iniciadores T3 e T7. B- *Southern-blot* dos fragmentos obtidos por hidrólise com *Hind*III e hibridação com a sonda IS1296P1L-R. 86
- FIGURA 4.6-** Hibridação com a sonda marcada IS1296P1L-R do DNA de alguns clones isolados, após hidrólise com a endonuclease *Hind*III. Estão também apresentados os perfis *Hind*III da estirpe B674P/93 e de outra estirpe portuguesa *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC 4366. 87
- FIGURA 4.7-** Avaliação, por análise electroforética, da extensão das deleções efectuadas por Exo III em DNA do plasmídeo recombinante linearizado. As amostras foram recolhidas periodicamente. A- Recombinante pBSIS114, condições de deleção: 75 mM NaCl, incubação com Exo III a 37°C, intervalos de colheita de 6 min. B- Recombinante pBSIS114, condições de deleção: 75 mM NaCl, incubação com Exo III a 37°C, intervalos de colheita de 3 min. 88

- FIGURA 4.8-** Sequência de resíduos nucleotídicos do fragmento de 5,6 kb da estirpe B676P/93. A tradução das regiões codificantes, correspondentes aos genes, foi inferida utilizando o programa MAP do GCG Wisconsin Package (versão 10.0). 92
- FIGURA 4.9-** Mapa genómico do fragmento de 5,6 kb da estirpe B676P/93 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. A caixa aberta indica a cópia do elemento IS1634. A caixa riscada representa as repetições directas de 115 pb, e as setas abertas as repetições invertidas de 13 pb, características do IS1634. 93
- FIGURA 4.10-** Alinhamento da sequência nucleotídica da cópia de IS1634, designada na figura por IS114, existente no fragmento *Hind*III de 5,6 kb da estirpe B676P/93, com cinco sequências publicadas de cópias do mesmo IS da estirpe Afadé de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. 95
- FIGURA 4.11-** Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica da transposase do IS1634 clonado (transp) e de três sequências aminoacídicas de transposases de três diferentes cópias de IS1634 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. 97
- FIGURA 4.12-** Alinhamento múltiplo da sequência polipeptídica inferida a partir da ORF1L114 (ORF1parcial), da sequência polipeptídica de uma lipoproteína putativa de membrana de *M. capricolum* subsp. *capricolum* (lipocapORF1), da sequência polipeptídica de uma lipoproteína putativa de membrana de *M. pulmonis* (lipompulORF1), da sequência polipeptídica de uma hipotética lipoproteína de membrana de *U. urealyticum* (ure1ORF1) e da sequência polipeptídica de uma hipotética proteína de ligação a ATP/GTP (ure2ORF1). 99
- FIGURA 4.13-** Alinhamento da sequência polipeptídica da região N-terminal inferida da ORF2R114 parcial e da sequência polipeptídica de uma hipotética proteína de *U. urealyticum*.. 99
- FIGURA 4.14-** Perfis de hidropatia (método Kyte-Doolittle) dos polipéptidos inferidos das ORF1L114 e ORF2R114, obtidos pelo programa PEPWINDOW. 102
- FIGURA 5.1-** Esquema do procedimento utilizado para purificação e separação de LMW-RNA. 115
- FIGURA 5.2-** Separação de LMW-RNA por electroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 12% com diferentes espessuras, em condições de diferença de potencial constante. 118
- FIGURA 5.3-** Separação de LMW-RNA por electroforese em gel de poliacrilamida a 12% sujeito a diferença de potencial constante. 119
- FIGURA 5.4- A-** Separação de LMW-RNA de subespécies do grupo “*Mycoplasma mycoides*” e de várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, por electroforese a potência constante de 60 W, em gel de poliacrilamida a 12% e 0,4 mm de espessura; **B-** Separação de LMW-RNA de membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*” por electroforese em gel de poliacrilamida a 12% e 0,4 mm de espessura, aplicando uma diferença de potencial crescente, durante 6 h 30 min. 120
- FIGURA 5.5-** Análise dos perfis de tRNA dos seis membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*”. 122
- FIGURA 5.6- A e B-** Dois aspectos da separação de LMW-RNA de várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, por electroforese em gel de poliacrilamida a 12%, a 350 V e 4 °C. 124

## INDÍCE DE TABELAS

<b>TABELA 1.1</b> – Características taxonómicas da classe <i>Mollicutes</i>	2
<b>TABELA 1.2</b> – Composição do grupo “ <i>Mycoplasma mycoides</i> ”	5
<b>TABELA 1.3</b> – Lipoproteínas de membrana e respectivos genes identificados no grupo “ <i>Mycoplasma mycoides</i> ”	7
<b>TABELA 1.4</b> – Métodos baseados em PCR mais utilizados para identificação de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC e de outros membros do grupo “ <i>Mycoplasma mycoides</i> ”	12
<b>TABELA 2.1</b> – Sequências de inserção identificadas no género <i>Mycoplasma</i>	24
<b>TABELA 2.2</b> –Estirpes de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC isoladas em Portugal e analisadas neste estudo.	28
<b>TABELA 3.1</b> – Estirpes de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC utilizadas neste estudo	44/45
<b>TABELA 3.2</b> – Iniciadores utilizados em reacções de PCR	47
<b>TABELA 4.1</b> – Plasmídeos obtidos por deleção com Exo III do plasmídeo pBSIS114 e utilizados para sequenciação do fragmento clonado da estirpe B676P/93	82
<b>TABELA 4.2</b> – Programas utilizados na análise <i>in silico</i> das sequências de nucleótidos obtidas e das sequências aminoacídicas inferidas	83
<b>TABELA 4.3</b> – Propriedades dos três polipéptidos putativos	98
<b>TABELA 5.1</b> – Perfil electroforético de tRNA para os diferentes membros do grupo “ <i>Mycoplasma mycoides</i> ” e para estirpes de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC utilizados neste estudo	123
<b>TABELA 6.1</b> – Avaliação sumária dos métodos utilizados para caracterizar estirpes do grupo “ <i>Mycoplasma mycoides</i> ”	132

---

## PREFÁCIO

A concepção do trabalho apresentado nesta tese sofreu vários ajustes, mas o pano de fundo foi sempre o estudo molecular do agente causal da Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB). O interesse e a pertinência deste tema, tanto a nível nacional como internacional, é mais do que justificado dados os graves prejuízos económicos que a PPCB acarreta. A necessidade de se conhecer mais profundamente as características moleculares do seu agente etiológico, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, é evidente, de modo a desenvolver métodos de diagnóstico rápidos e fiáveis e vacinas eficazes muito requeridas em África.

Desde o ressurgimento da doença em Portugal, no início dos anos 80, que o Departamento de Bacteriologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária tem vindo a desenvolver intenso trabalho nesta área, não só a nível de diagnóstico de rotina, sendo laboratório de referência nacional e internacional da PPCB, mas também a nível de investigação aplicada.

O interesse a nível internacional pela PPCB é revelado pelo número significativo de artigos publicados que têm como material de estudo *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Contudo, foi o apoio dado pela União Europeia a dois projectos de cooperação científica que melhor evidenciou a pertinência deste tema. Cerca de 10 países estiveram envolvidos nestes projectos, que muito contribuíram para a formação de investigadores, divulgação de resultados e avanço do conhecimento da doença e do seu agente causal.

Alguns temas apresentados nesta dissertação constituíram, assim, linhas de investigação dos seguintes projectos:

- Projecto FAIR-CT95-0711 "Development of new and improved diagnostic tests for Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) in Europe".
- Projecto COST-Action 826 "Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics".

Do trabalho desenvolvido resultaram as seguintes publicações, que constituem os temas dos Capítulos 2, 3 e 5:

- Botelho, A., J. Frey, J. Regalla & J. Nicolet. 1998. DNA fingerprinting of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates with the insertion element IS1296. In: G. Leori, F. Santini, E. Scanziani & J. Frey (Eds), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 2, European Commission, EUR 18018 EN, Luxembourg. pp. 148-151.



- Botelho, A ., A . Prata & J. Regalla. 2000. Analyses of low-molecular-weight RNA profiles of members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *In*: D. Bergonier, X. Berthelot & J. Frey (Eds.), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 4, European Commission, EUR 19245 EN, Luxembourg. pp. 135-138.
- Botelho, A ., A . Prata & J. Regalla. 2001. Use of low molecular weight RNA profiles to characterise members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *In*: J. B. Poveda, A. Fernández, J. Frey & K.-E. Johansson (Eds.), COST Action 826. Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 5, European Commission, EUR 19693, Luxembourg. pp. 50-53.
- Vilei, E. M., E.-M. Abdo, J. Nicolet, A. Botelho, R. Gonçalves & J. Frey. 2000. Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology* **146**: 477-486.

A orientação científica do trabalho aqui descrito, desenvolvido no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, competiu ao Prof. Doutor Joachim Frey, Director do Institute for Veterinary Bacteriology da Universidade de Berna, Suíça, no âmbito do Projecto COST - Action 826.

1



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1- TAXONOMIA E ECOLOGIA DO GÉNERO *MYCOPLASMA*

O desenvolvimento de métodos moleculares marcou o começo de uma nova era na Microbiologia e levou ao despontar de uma variedade de novas possibilidades para tentar compreender, detectar, descrever e classificar os microrganismos.

Desde a descoberta do primeiro micoplasma, por Nocard e Roux em 1898, que as características deste grupo de microrganismos representam um enigma permanente para os microbiologistas. Considerados vírus desde o princípio do século XIX até ao início do segundo quartel do século XX, os micoplasmas viram a sua verdadeira natureza definida em 1930. Até finais dos anos 60 foram confundidos com variantes estáveis das formas L bacterianas, até que a análise genómica pôs de parte qualquer relação dos micoplasmas com as formas L, i.e. formas instáveis, sem parede celular, de bactérias comuns.

Os micoplasmas são eubactérias (domínio *Bacteria*) sem parede celular, parasitas de tecidos e órgãos de eucariontes e filogeneticamente derivadas de bactérias gram-positivas por um processo de evolução redutora ou degenerativa (Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). A hipótese mais provável até hoje apresentada postula que os micoplasmas evoluíram de um antepassado comum, derivado do ramo filogenético dos *Streptococcus* e com um genoma de cerca de 2 Mb, que existiu há cerca de 600 milhões de anos.

Com base na ausência de parede celular, na tendência para formar colónias em forma de ovo estrelado em meio sólido, na capacidade de passar através de filtros com poros de 200 nm, no seu genoma de tamanho reduzido (0,58 a 2,2 Mb), com baixa composição em G+C (23-40 mol%) (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, 1995), os micoplasmas foram classificados numa classe separada – *Mollicutes* (em Latim *mollis*, macio; *cutis*, pele). O termo comum micoplasmas tem sido utilizado para designar qualquer espécie incluída na classe *Mollicutes*.

Presentemente, a classe *Mollicutes* compreende cerca de 200 espécies taxonomicamente divididas (Tabela 1.1) em quatro ordens, cinco famílias e oito géneros validamente descritos (Tully *et al.*, 1993). Um grupo de posição taxonómica indefinida, denominado *Phytoplasma*, foi proposto para designar os micoplasmas não-cultiváveis de plantas e de insectos, até aqui designados por *Mycoplasma-like organisms* (MLOs).

Tabela 1.1– Características taxonómicas da classe *Mollicutes*

Classificação <sup>a</sup>	No. de espécies	Tamanho genoma (kb)	Mol% G+C	Necessidade de colesterol	Habitat
Ordem I: <i>Mycoplasmatales</i>					
Família I: <i>Mycoplasmataceae</i>					
Género I: <i>Mycoplasma</i>	102	580-1350	23-40	Sim	Humanos e animais
Género II: <i>Ureaplasma</i>	6	760-1170	27-30	Sim	
Ordem II: <i>Entomoplasmatales</i>					
Família I: <i>Entomoplasmataceae</i>					
Género I: <i>Entomoplasma</i>	6	790-1140	27-29	Sim	Insectos e plantas
Género II: <i>Mesoplasma</i>	12	870-1100	27-30	Não	
Família II: <i>Spiroplasmataceae</i>					
Género I: <i>Spiroplasma</i>	34	780-2220	24-31	Sim	Insectos e plantas
Ordem III: <i>Acholeplasmatales</i>					
Família I: <i>Acholeplasmataceae</i>					
Género I: <i>Acholeplasma</i>	13	1500-1650	26-36	Não	Animais, insectos e plantas
Ordem IV: <i>Anaeroplasmatales</i>					
Família I: <i>Anaeroplasmataceae</i>					
Género I: <i>Anaeroplasma</i>	4	1500-1600	29-34	Sim	Rúmen de bovino/ovino
Género II: <i>Asteroplasma</i>	1	1500	40	Não	

<sup>a</sup>Os fitoplasmas não são reconhecidos como um género, visto não se desenvolverem em meio de cultura.

Os micoplasmas são os mais pequenos e simples procariontes com capacidade de auto-replicação. A sua célula contém apenas o conjunto mínimo de organelos essenciais para o crescimento e multiplicação: uma membrana plasmática, ribossomas e uma molécula de DNA circular de cadeia dupla (Razin, 1978). Devido à limitada capacidade codificante do seu genoma, os micoplasmas não possuem muitas das vias biossintéticas características da maior parte das bactérias (Dybvig & Voelker, 1996). Dependem essencialmente do seu hospedeiro para a gama completa de aminoácidos, ácidos gordos, colesterol e vitaminas. Exceptuando as espécies dos géneros

*Acholeplasma*, *Asteroplasma* e *Mesoplasma*, todos os outros micoplasmas cultiváveis requerem colesterol para se desenvolverem.

A utilização de códons é outro aspecto que os distingue de outras eubactérias, sendo o triptofano (Trp) codificado pelo codão TGA nos géneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma* e *Mesoplasma*, enquanto que os géneros *Acholeplasma*, *Asteroplasma*, *Anaeroplasma* e *Phytoplasma* usam o código genético universal, no qual TGA é um codão de terminação (Maniloff, 1992; Razin *et al.*, 1998).

O genoma de 580 kb de *Mycoplasma genitalium* foi um dos primeiros genomas a ser completamente sequenciado (Fraser *et al.*, 1995). Na altura era o mais reduzido genoma bacteriano conhecido, mas verificou-se depois que um fitoplasma não-cultivável possui um genoma ainda mais pequeno de apenas 530 kb (Marcone *et al.*, 1999). Outros genomas de micoplasmas foram, entretanto, também sequenciados: o de *M. pneumonia*, com 816 kb (Himmerleisch *et al.*, 1997) e o de *Ureaplasma urealyticum*, com 752 kb (Glass *et al.*, 1998), ambas as espécies de origem humana, tal como *M. genitalium*. Relativamente aos micoplasmas isolados de animais, está em fase final a sequenciação do genoma da estirpe PG1 de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (National Veterinary Institute, Uppsala & The Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suécia), esperando-se para breve a sua publicação. O genoma de *Mycoplasma capricolum* começou a ser sequenciado em 1990, mas em 1995 apenas eram conhecidas 214 kb de um genoma superior a 1000 kb (Razin *et al.*, 1998). Dos micoplasmas animais, apenas o genoma de *Mycoplasma pulmonis*, causador de doenças respiratórias em roedores, com 964 kb, foi completamente sequenciado até à data (Chambaud *et al.*, 2001). Este micoplasma possui um teor de G+C de 26,6 mol%, o mais baixo encontrado em bactérias, se exceptuarmos o de *U. urealyticum*.

A maior parte dos micoplasmas são parasitas de mamíferos, aves, répteis, artrópodes, plantas e peixes, dos quais muitos são patogénicos. De um modo geral, existe uma certa especificidade em relação ao hospedeiro e ao local de infecção, embora ocorram algumas excepções (Nicholas *et al.*, 1998; Razin,

1992). Para além deste aspecto parasitário, os micoplasmas são também conhecidos como contaminantes usuais de culturas de células.

Nenhum outro grupo de procariontes esteve tão envolvido em controvérsia como os micoplasmas, ao tentar estabelecer-se uma fronteira de patogenicidade clara. Muitos micoplasmas vivem como comensais, podendo ser considerados simbiossiontes em muitos artrópodes (Razin, 1978). No caso de haver patogenicidade, as infecções devidas a micoplasmas são raramente fulminantes, seguindo uma evolução do tipo crónico. A sua virulência é inegavelmente complexa e as suas excepcionais e únicas características biológicas permitem-lhes interagir com o hospedeiro de um modo diferente dos agentes bacterianos patogénicos típicos.

Como já referimos, muitos dos micoplasmas isolados de diferentes espécies animais são patogénicos e de grande importância em medicina veterinária. Nos ruminantes, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumonia*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma bovoculi*, *Mycoplasma californicum* e *Mycoplasma ovipneumonia* são exemplos de espécies que causam diferentes doenças graves (DaMassa *et al.*, 1992; Hale *et al.*, 1962; MacOwan, 1984; MacOwan & Minette, 1976; Ross, 1993; Simecka *et al.*, 1992).

Um grupo importante de micoplasmas de origem animal é o chamado grupo "*Mycoplasma mycoides*" (Cottew *et al.*, 1987), que compreende seis espécies e subespécies muito próximas, patogénicas para bovinos, ovinos e caprinos: *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumonia* e *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino (Tabela 1.2). Todos os membros do grupo têm importância clínica para os ruminantes, sendo mais importantes as espécies *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e *M. capricolum* subsp. *capripneumonia* (Leach *et al.*, 1993), agentes etiológicos da

peripneumonia contagiosa bovina (PPCB) e da pleuropneumonia caprina (PPCC), respectivamente. Todos os membros do grupo fermentam a glucose, sendo a distinção entre eles difícil devido à sobreposição de características culturais, bioquímicas, imunológicas e genéticas. Diferentes abordagens têm sido desenvolvidas para tentar diferenciar os elementos do grupo "*Mycoplasma mycoides*" (Abu-Groun *et al.*, 1994; Poumarat *et al.*, 1992;) e possibilitar o diagnóstico fiável das micoplasmoses.

**Tabela 1.2-** Composição do grupo "*Mycoplasma mycoides*"

	<b>Espécie</b>	<b>Estirpe tipo</b>	<b>Doença</b>	<b>Hospedeiro principal (e outros)</b>
Sub-grupo 1	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	PG1	Peripneumonia (PPCB)	Bovinos (caprinos, ovinos e búfalo)
	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	Y Goat	Pneumonia, mamite, artrite	Caprinos (ovinos, bovinos)
	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3	Pneumonia	Caprinos (raro)
Sub-grupo 2	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California Kid	Pneumonia, artrite, mamite	Caprinos (ovinos, bovinos)
	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumonia</i>	F38	Pleuropneumonia (PPCC)	Caprinos
	<i>Mycoplasma</i> sp. grupo 7 bovino	PG50	Artrite, mamite, pneumonia	Bovinos

## 1.2- MYCOPLASMA MYCOIDES SUBSP. MYCOIDES SC

O agente etiológico da PPCB foi o primeiro micoplasma a ser isolado e descrito (Nocard & Roux, 1898), embora a doença fosse já conhecida desde o fim do século XVII. Em 1956, Edward e Freundt identificaram-no definitivamente como *M. mycoides* subsp. *mycoides* e designaram-no para espécie tipo da classe *Mollicutes*. Cottew e Yeats (1978), ao reconhecerem a existência de duas variantes morfológicas: um biótipo *small colony* (SC), responsável pela PPCB nos bovinos, e um biótipo *large colony* (LC), responsável por pneumonias, artrites e mamites nos caprinos e ovinos, propuseram a alteração do nome para *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

No diagnóstico de rotina a distinção entre os dois biótipos faz-se com base na capacidade de digestão da caseína, liquefacção de soro e sobrevivência a 45°C, características apresentadas pelo biótipo LC (Brown & Ambrose, 1990). Outras características bioquímicas diferenciais foram observadas, tais como a presença das enzimas  $\alpha$ -glucosidade e transcarbamilase de ornitina no biótipo LC (Salih *et al.*, 1993). O biótipo SC distinguia-se através de diferenças na utilização de substratos, não fermentando a maltose, a trealose e a manose quando em baixas concentrações (Abu-Groun *et al.*, 1994).

Alguns membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*", incluindo *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, possuem uma estrutura semelhante a uma cápsula formada por galactano, um polímero de galactofuranose que representa 90% da totalidade de hidratos de carbono dos micoplasmas e cuja composição exacta varia com a espécie (Egwu *et al.*, 1996). Pensa-se que esta cápsula de polissacáridos de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC tenha um papel importante na agressividade da PPCB, promovendo a ligação do agente infeccioso ao tecido do hospedeiro e aumentando a resistência à fagocitose. Ao induzir uma resposta auto-imune, a cápsula também poderá ter um efeito tóxico nas células hospedeiras (Nicholas *et al.*, 2000). Este complexo capsular poderá, assim, ser um potencial candidato para o desenvolvimento de vacinas (March *et al.*, 1999 a).

### *Proteínas Imunogénicas*

Com o objectivo de caracterizar antígenos mais sensíveis e específicos de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, que possibilitem não só um diagnóstico mais eficiente da PPCB, mas, também, o desenvolvimento de vacinas, vários genes têm sido clonados e expressos. O gene codificante de uma lipoproteína imunogénica de massa molecular 72 kDa, denominada P72, foi identificado, caracterizado e expresso em *E. coli* (Cheng *et al.*, 1996). Esta proteína era expressa por várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, mas não por outros membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*", embora parecesse pertencer a uma família de proteínas típicas de micoplasmas deste grupo. Tal hipótese foi confirmada mais tarde (Monnerat *et al.*, 1999), ao verificar-se que



uma lipoproteína de 62 kDa, expressa em *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subsp. *capri*, apresentava características estruturais e funcionais semelhantes à lipoproteína P72 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Cheng *et al.*, 1996) e à proteína P67 de *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino (Frey *et al.*, 1998). Estas duas últimas proteínas apresentaram 91% de homologia nos seus resíduos aminoacídicos, conduzindo a reacções cruzadas quando analisadas por *immunoblotting* (Cheng *et al.*, 1996; Frey *et al.*, 1998) dos antígenos totais das duas sub-espécies contra antisoros anti-P72 e anti-P67. A esta família de lipoproteínas foi atribuída nova designação (LppA), dada a sua homologia estrutural e funcional (Monnerat *et al.*, 1999). Contudo, com base nos genes codificantes de cada uma destas proteínas foi possível desenhar-se iniciadores para a amplificação por PCR de um fragmento específico de cada espécie estudada, excepto de *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subsp. *capri* que apresentavam genes idênticos, não sendo possível a sua distinção (Monnerat *et al.*, 1999).

**Tabela 1.3-** Lipoproteínas de membrana e respectivos genes identificados no grupo *Mycoplasma mycoides*

Membro do grupo	Proteína	kDa	Gene	Referência
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	LppA[MmymySC]	72	<i>lppA</i> [MmymySC]	Cheng <i>et al.</i> , 1996
<i>M. sp.</i> grupo 7	LppA[Mbgr7]	67	<i>lppA</i> [Mbgr7]	Frey <i>et al.</i> , 1998
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	LppA[Mmyca]	62	<i>lppA</i> [Mmyca]	Monnerat <i>et al.</i> , 1999
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	LppA[MmymyLC]	62	<i>lppA</i> [MmymyLC]	Monnerat <i>et al.</i> , 1999
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	LppB [MmymySC]	70	<i>lppB</i> [MmymySC]	Vilei <i>et al.</i> , 2000
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	LppB [MmymyLC]	70	<i>lppB</i> [MmymyLC]	Vilei <i>et al.</i> , 2000
<i>M. sp.</i> grupo 7	LppB[Mbgr7]	70	<i>lppB</i> [Mbgr7]	Vilei <i>et al.</i> , 2000
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	LppQ	48	<i>lppQ</i>	Abdo <i>et al.</i> , 2000

Uma lipoproteína homóloga a LppB existe também nos restantes membros do grupo "*M. mycoides*", como foi verificado em testes de *immunoblotting*.

A lipoproteína LppQ, um antígeno de 48 kDa, e o respectivo gene *lppQ* foram identificados e caracterizados em todas as estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC analisadas (Abdo *et al.*, 2000), de origem europeia, africana e australiana, incluindo estirpes vacinais. Não foi detectada nos outros membros do grupo *M. mycoides*, nem em outros micoplasmas de

ruminantes. A análise estrutural do domínio N-terminal da proteína madura mostrou que esta região era exposta na superfície da membrana. Tanto os soros de animais experimentalmente infectados com estirpes europeias ou africanas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, como os soros de doentes naturais reagiram fortemente com este domínio N-terminal (proteína recombinante LppQ-N'). Assim se comprovou que a região da lipoproteína LppQ exposta à superfície tinha a capacidade de induzir uma forte reacção imune, precoce, persistente e específica nos bovinos.

#### *RNAs de transferência*

A espécie de micoplasma mais bem estudada relativamente aos RNAs de transferência (tRNAs) tem sido *M. capricolum*, e nestes estudos se baseia toda a informação relativa aos componentes da máquina de tradução destes microrganismos.

*M. capricolum* possui 30 genes de 29 moléculas de tRNA, sendo o primeiro sistema genético, de entre os vários organismos e organelos, cuja sequência completa de tRNAs foi determinada tanto a nível de RNA como de DNA (Muto *et al.*, 1992). Ao contrário de outras bactérias, nos micoplasmas não se encontraram genes de tRNA na região espaçadora entre os genes de RNA ribossómico (rRNA) 16S e 23S. Dos trinta genes de tRNA existentes em *M. capricolum*, vinte e dois estão organizados em três grupos de nove, cinco e quatro genes, respectivamente, e em dois grupos de dois genes cada. Os restantes oito genes estão, cada um, num único operão. Esta organização dos genes de tRNA é muito semelhante ao que se observou em *Bacillus subtilis*. A organização e a estrutura dos genes indispensáveis à multiplicação celular do organismo, como é o caso dos tRNA, rRNA e proteínas ribossómicas, foram altamente conservadas nos micoplasmas ao longo da evolução. A característica mais evidente nos micoplasmas é a de que as moléculas de tRNA contêm poucos nucleósidos modificados, ao contrário de outras eubactérias. Este facto é provavelmente consequência da minimização do genoma dos micoplasmas, o que levou à redução do número de enzimas envolvidos na modificação dos nucleósidos dos tRNA.

### *Detecção e identificação*

Tradicionalmente, os micoplasmas, tal como outras bactérias, são detectados após cultura e isolamento. A identificação da cultura pura de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC é essencial para a confirmação de focos, particularmente em áreas até aí isentas. Para além disto, a OIE (*Office International des Epizooties*) requer os resultados das provas culturais aos países que desejem declarar-se livres da PPCB, com base nas recomendações oficiais para controlo epidemiológico da doença.

*M. mycoides* subsp. *mycoides* SC não é dos micoplasmas mais fastidiosos, mas requer meios de cultura específicos e selectivos com soro animal inactivado e antibiótico incorporado para, respectivamente, fornecimento de colesterol e inibição do crescimento de bactérias com parede celular. Têm sido descritos muitos meios de cultura que permitem o desenvolvimento de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Freundt, 1983; Nicholas & Baker, 1998), dependendo a escolha da concentração celular desejada e do objectivo (isolamento e identificação, produção de antigénios ou vacinas, extracção de ácidos nucleicos).

Os métodos para identificação das estirpes isoladas são baseados em características culturais, nutricionais, bioquímicas e serológicas. O teste serológico de inibição de crescimento com antisoros policlonais é pouco específico, pelo que anticorpos monoclonais têm sido produzidos para permitir uma distinção mais eficiente e rigorosa entre *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e outros micoplasmas (Rurangirwa *et al.*, 2000).

Embora os métodos fenotípicos tradicionais sejam, em muitos casos, eficientes e recomendados para detectar bactérias, há muitas razões que justificam a introdução de métodos moleculares. Dependendo do microrganismo, o crescimento em cultura pode ser difícil ou até mesmo impossível. Mesmo usando meios selectivos, quanto mais tempo demorar o desenvolvimento de uma bactéria, maior o risco de crescimento de competidores de crescimento rápido. Há também microrganismos demasiado perigosos para serem manipulados como células vivas, devido ao seu elevado

grau de patogenicidade. Por último, existem também algumas limitações à capacidade discriminatória dos métodos convencionais de tipificação. Todos estes factores explicam o desenvolvimento dos métodos moleculares nas últimas décadas e a sua aplicação cada vez maior no diagnóstico de rotina. O uso de sondas de DNA e a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tornaram-se muito comuns para a detecção e identificação de microrganismos.

### *Métodos baseados em PCR*

De todas as técnicas de biologia molecular desenvolvidas nas últimas décadas do séc. XX, a técnica de PCR é provavelmente a que tem tido o maior impacto. Milhares de artigos incidindo sobre PCR têm sido publicados desde as publicações originais (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). A técnica de PCR foi rapidamente adoptada para o diagnóstico de doenças infecciosas.

O poder do PCR está em promover o crescimento exponencial do número inicial de cópias do alvo desejado. Tal é obtido pela síntese repetida do DNA-alvo, em que os novos fragmentos sintetizados servem também de molde nos ciclos seguintes. Contudo, a sua alta sensibilidade constitui também o maior risco do método. Se, para além da sequência-alvo desejada, outra sequência de ácido nucleico é amplificada, o seu número de cópias aumentará também exponencialmente. É por essa razão que é tão importante o desenho dos iniciadores oligonucleotídicos e também a preparação da amostra (Belak & Ballagi-Pordany, 1993). A região alvo deverá ser específica e ter um certo grau de variabilidade em organismos filogeneticamente próximos. Se for uma região muito conservada, poderá ser amplificada em qualquer organismo.

A preparação da amostra para PCR é outro aspecto crucial, visto ser um factor que condiciona o resultado da análise (Botelho *et al.*, 1997). A contaminação cruzada entre amostras é sempre um risco que tem de ser controlado por meio de controlos negativos frequentes. Inibidores que impedem a reacção constituem outro factor a ter em consideração, especialmente se se tratar de material biológico complexo como amostras clínicas. Neste caso, põe-se a hipótese de ocorrência de falsos negativos, que pode ser avaliada utilizando na reacção um controlo interno positivo (Ballagi-Podany & Belak, 1996).

Quando se compara a sensibilidade da técnica de PCR para detecção com os métodos bacteriológicos convencionais de cultura, o PCR é, geralmente, considerado mais sensível. Em teoria isto pode ser verdade, especialmente se o PCR for dirigido para uma região-alvo que se encontre em cópias múltiplas, como os genes de RNA ribossómico ou elementos de inserção. Se tal não for o caso, é necessário dar particular atenção a aspectos que vão afectar a sensibilidade, como seja a presença de inibidores em amostras clínicas (Botelho & Regalla, 1996).

Vários sistemas de PCR, mais ou menos simples, foram desenvolvidos para rápida e especificamente detectar e identificar *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e diferenciar os membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*". Estes testes foram desenhados com base em sequências de função desconhecida ou em sequências de genes (Bashiruddin *et al.*, 1994; Dedieu *et al.*, 1994; Hotzel *et al.*, 1996; Miserez *et al.*, 1997; Persson *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1997). Em alguns destes métodos a confirmação da presença de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC foi feita por hidrólise com uma endonuclease de restrição do produto amplificado (Bashiruddin *et al.*, 1994; Dedieu *et al.*, 1994; Hotzel *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1999). O método clássico de detecção dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, foi substituído por outros métodos que permitiam uma certa automatização, como é o caso do PCR colorimétrico, ou melhoravam a sensibilidade (Bashiruddin *et al.*, 1999; Botelho *et al.*, 1999, Persson *et al.*, 1999). Alguns destes métodos baseados em PCR foram utilizados para a detecção e a identificação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC em cultura ou em material clínico, incluindo muco nasal, líquido pleural, tecido pulmonar, gânglios linfáticos e sêmen de bovinos (Bashiruddin *et al.*, 1994a; Bashiruddin *et al.*, 1999a; Nicholas *et al.*, 1994; Stradaioli *et al.*, 1999). Na Tabela 1.4 estão listados os métodos baseados em PCR que foram desenvolvidos para a detecção e identificação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e de outros membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*".

**Tabela 1.4-** Métodos baseados em PCR mais utilizados para identificação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e de outros membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*"

DNA-alvo	Produto amplificado (pb)	Endonucleas e de restrição <sup>#</sup>	Produtos de hidrólise (pb)	Especificidade	Referência
CAP-21 <sup>*</sup>	1517-1572	--		Grupo <i>Mycoplasma mycoides</i>	Bashiruddin <i>et al.</i> , 1994
	574	<i>AsnI</i>	379, 178 220, 178, 153	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC <i>M.m.mLC/M.m.capri</i>	
CAP-21	457-466	--		Grupo <i>Mycoplasma mycoides</i>	Dedieu <i>et al.</i> , 1994
	275	<i>Asel</i>	232, 43	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	
CAP-21	253-265	<i>ApoI</i>	227	Grupo <i>Mycoplasma mycoides</i>	Hotzel <i>et al.</i> , 1996
	191	--		<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	
Gene <i>lppA</i>	717	--		<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Miserez <i>et al.</i> , 1997
	503	--		<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	
Gene rRNA 16S	785	<i>AluI</i>	370, 236, 184/6, 98, 81	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Persson <i>et al.</i> , 1999
	129, 127			<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	
Gene rRNA 16S	548	--		Grupo <i>M. mycoides</i>	Basculana <i>et al.</i> , 1994
	548	<i>PstI</i>	548, 420, 128	<i>Mycoplasma .sp.</i> F38	

<sup>\*</sup>Sequência de função desconhecida; <sup>#</sup>Endonucleases usadas para confirmar a identificação.

### Epidemiologia molecular

Sob o ponto de vista epidemiológico, é importante a tipificação e a subtipificação de microrganismos para determinar a fonte de infecção, reconhecer estirpes particularmente virulentas e acompanhar programas de vacinação. Para atingir estes objectivos, diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, com vantagens e inconvenientes. O método escolhido depende da disponibilidade de equipamento e material, e também da pergunta, a nível epidemiológico, para a qual se quer obter resposta. Investigar a epidemiologia de uma infecção num curto período e numa área limitada é diferente de pesquisar o possível antepassado comum do

agente causal de uma doença que apareceu em diferentes continentes durante várias décadas.

Muitos dos métodos utilizados baseiam-se na análise de todo o cromossoma. O método de electroforese em campo pulsado PFGE (Schwartz & Cantor, 1984) é considerado o método de opção para a tipificação molecular. Outros métodos baseiam-se em PCR e na análise, em electroforese simples ou em campo pulsado, de polimorfismos no tamanho dos fragmentos de restrição-RFLP (Botelho *et al.*, 1994).

Com base na análise electroforética de proteínas em SDS-PAGE, Costas *et al.* (1987) não conseguiram distinguir quatro estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Num estudo mais alargado, Gonçalves *et al.* (1998) detectaram algumas diferenças no perfil proteico e na análise por *immunoblotting* de diversas estirpes de referência e de isolados de várias áreas geográficas. Outro estudo com base na análise de *immunoblots* (Poumarat & Salsona, 1995) mostrou que a maioria das estirpes italianas analisadas apresentavam um polipéptido ausente noutras estirpes europeias, sugerindo uma origem diferente para essas estirpes.

A análise dos perfis de restrição de 46 estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC revelou que as estirpes europeias apresentavam um perfil diferente do das africanas (Poumarat & Salsona, 1995).

Outro marcador epidemiológico foi constituído pelas sequências de inserção identificadas em *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC como IS1296 (Frey *et al.*, 1995) e IS1634 (Vilei *et al.*, 1999), utilizadas em estudos de polimorfismos relativamente ao seu número e localização em várias estirpes de diferentes origens geográficas, incluindo estirpes vacinais (Botelho *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1995; March *et al.*, 2000). Estes estudos também revelaram a existência de dois grupos de estirpes, um europeu e outro africano/australiano (Cheng *et al.*, 1995).

### *Sequências de inserção*

Sequências de inserção (IS - *insertion sequences*) são segmentos de DNA móveis, de 800 a 2500 pb, que originam diferentes tipos de rearranjos, tais

como deleções, inversões, duplicações e réplicas, devido à sua capacidade de se transporem (Ohtsubo & Sekine, 1996), tal como os transposões. A transcrição de genes flanqueadores aos IS pode ser feita a partir de promotores localizados nos IS, ou a partir de promotores criados pela inserção devido a rearranjos do genoma. Os IS podem, assim, activar a transcrição de genes ou desactivar essa transcrição, ao fragmentar um gene ou o seu promotor. A especificidade de inserção em relação a uma determinada sequência-alvo varia consoante esta sequência e o elemento de inserção. Determinadas sequências de DNA-alvo possuem locais de inserção preferenciais de IS específicos. A capacidade de excisão é outra característica dos IS, podendo restaurar a função de um gene inactivado pela inserção ou alterar a polaridade de genes localizados a jusante do local de inserção (Galas & Chandler, 1989).

Os elementos de inserção contêm uma ou mais grelhas de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*) que codificam uma enzima, transposase, necessária para a transposição. As terminações da maior parte dos elementos de inserção conhecidos possuem repetições invertidas (IR – *Inverted Repeats*), com cerca de 14-40 pb, que são também necessárias para a transposição. Estas repetições terminais são locais de reconhecimento da enzima transposase durante o processo de transposição. Nos locais de inserção, os IS originam pequenas duplicações repetidas a partir directamente do DNA-alvo. Este facto é, provavelmente, devido à clivagem aleatória do DNA-alvo pelas transposases. Alguns elementos parecem induzir uma duplicação em número fixo de 2 a 13 pb, enquanto outros apresentam variações no tamanho da duplicação do DNA-alvo.

Existem várias famílias de IS classificadas de acordo com a sua estrutura, mecanismos de transposição e expressão genética ou homologia dos genes que codificam as transposases. Em algumas famílias de IS o leque de hospedeiros é extremamente variado.

Algumas famílias de IS, tanto em procariontes como em eucariontes, requerem mudança de grelha (*frameshifting*) no processo de tradução, para produzir a transposase activa que promove a clivagem e integração dos IS.



Outros IS utilizam mecanismos de expressão genética e de transposição semelhantes aos utilizados pelos retrovírus e retrotransposições.

A maior parte dos elementos IS identificados distribuem-se por onze famílias (Ohtsubo & Sekine, 1996), tendo os membros de cada uma delas características estruturais comuns, associadas a funções semelhantes e domínios conservados da enzima transposase.

O cromossoma da estirpe K-12 de *Escherichia coli* e o plasmídeo F, assim como o cromossoma de outras *Enterobacteriaceae*, possuem o elemento de inserção IS3 que dá nome a uma das famílias. Esta família IS3 tem como característica comum repetições invertidas terminais imperfeitas (IRL e IRR) com cerca de 39 pb as quais, ao inserirem-se, originam duplicação de 3 pb da sequência-alvo. Quase todos os membros desta família possuem duas ORF, *orfA* e *orfB*, que codificam a enzima transposase por um fenómeno de *frameshifting* durante a expressão genética.

A família de sequências de inserção IS4 possui repetições invertidas de cerca de 18 pb e origina repetições directas da sequência - alvo de 11-13 pb, no local da inserção. Esta família só possui uma ORF que codifica uma enzima transposase. Uma das regiões conservadas da transposase, na extremidade C-terminal, possui mais de 60% de homologia com os vários membros da família e foi designada por C1.

Na classe *Mollicutes*, a primeira sequência de inserção (IS1221) foi identificada em *Mycoplasma hyopneumonia*, agente da pneumonia enzoótica em suínos. Esta sequência, de distribuição variável e em pequeno número de cópias, possui 1550 pb, com 28 pb de repetições invertidas terminais e duas ORF, existindo também em *Mycoplasma hyorhinis* e em *Mycoplasma flocculare*, ambos isolados do tracto respiratório de suínos (Ferrell *et al.*, 1989). No género *Mycoplasma* foram ainda identificados um elemento genético semelhante a IS em *Mycoplasma incognitus* (Hu *et al.*, 1990), e a sequência IS1138, em *M. pulmonis* (Bhugra & Dybvig, 1993).

Em *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC foram identificadas duas sequências de inserção: IS1296 (Frey *et al.*, 1995) e IS1634 (Vilei *et al.*, 1999),

pertencentes, respectivamente, à família IS3 e IS4. Sequências semelhantes a IS1296 foram identificadas também na estirpe Y Goat de *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, com cinco cópias, e na estirpe PG50 de *Mycoplasma* sp. grupo7 bovino, com duas cópias.

Pelo contrário, a sequência IS1634, com uma dimensão de 1872 pb, incluindo 13 pb de repetições invertidas terminais, é exclusiva de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, existindo em 30 cópias no genoma de todas as estirpes testadas, mas estando ausente nas restantes espécies do grupo "*Mycoplasma mycoides*", em *M. agalactiae* e em *M. bovis* (Vilei *et al.*, 1999). A hibridação entre o DNA de várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, hidrolisado com uma endonuclease de restrição, e uma sonda derivada da sequência IS1634 produziu padrões que, apesar de relativamente homogêneos, permitiram distinguir isolados australianos e africanos de isolados europeus. No entanto, de um modo geral, poucas diferenças intraspecíficas foram notadas, o que limitou o uso desta sonda para fins epidemiológicos.

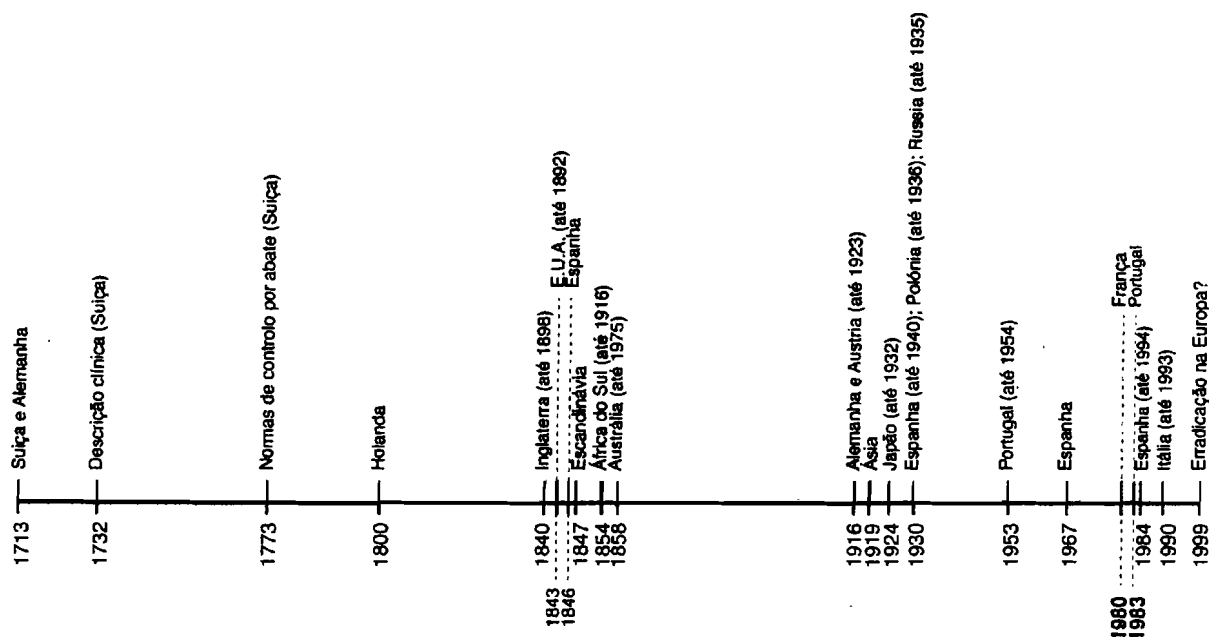
Ambas as sequências de inserção evidenciaram uma baixa frequência de transposição, o que indica uma alta estabilidade do genoma de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

### 1.3- PERIPNEUMONIA CONTAGIOSA BOVINA (PPCB)

A peripneumonia contagiosa bovina é uma doença grave dos bovinos (*Bos taurus*), zebu (*Bos indicus*) e búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*), sendo o búfalo selvagem (*Syncerus caffer*) resistente (ter Laak, 1992). Devido ao seu impacto sócio-económico nas regiões endémicas, foi declarada pelo OIE como uma doença pertencente à Lista A, requerendo medidas especiais internacionais para o seu controlo e erradicação.

Diferentes aspectos relativos à PPCB e ao seu agente etiológico, como a sua prevalência, sintomatologia, patologia, epidemiologia e diagnóstico, têm sido abordados em vários artigos de revisão (Egwu *et al.*, 1996; ter Laak, 1992; Nicholas & Bashiruddin, 1995; Nicholas *et al.*, 2000; Provost *et al.*, 1987).

O registo mais antigo da existência de PPCB data de 1713, quando a doença ocorreu na Alemanha e Suíça. Durante o séc. XVIII foi introduzida em muitos países europeus, causando graves perdas económicas. Foi endémica em todos os continentes durante o séc. XIX, existindo em grande parte dos países europeus, nos Estados Unidos da América (1843), África do Sul (1854), Austrália (1858) e Ásia. A partir do séc. XIX foi sendo erradicada de vários países da Europa, dos Estados Unidos da América, África do Sul e Austrália, devido à aplicação de medidas sanitárias rigorosas: proibição do movimento de gado, abate de gado doente ou suspeito e vacinação. Apenas alguns focos persistiram na Europa: Alemanha e Áustria (até 1923), Polónia (até 1936). A PPCB reapareceu na Europa nos anos 50-60, com focos esporádicos em 1953 e 1954 em Portugal (Regalla *et al.*, 1996), e em 1967 na fronteira franco-espanhola. Seguiu-se um interregno de cerca de trinta anos (Fig. 1.1), mas a partir de 1980 recomeçaram a aparecer surtos em França (1980, 1982, 1984), Portugal (desde 1983) (Regalla, 1984), Espanha (1984) e Itália (1990-1993).



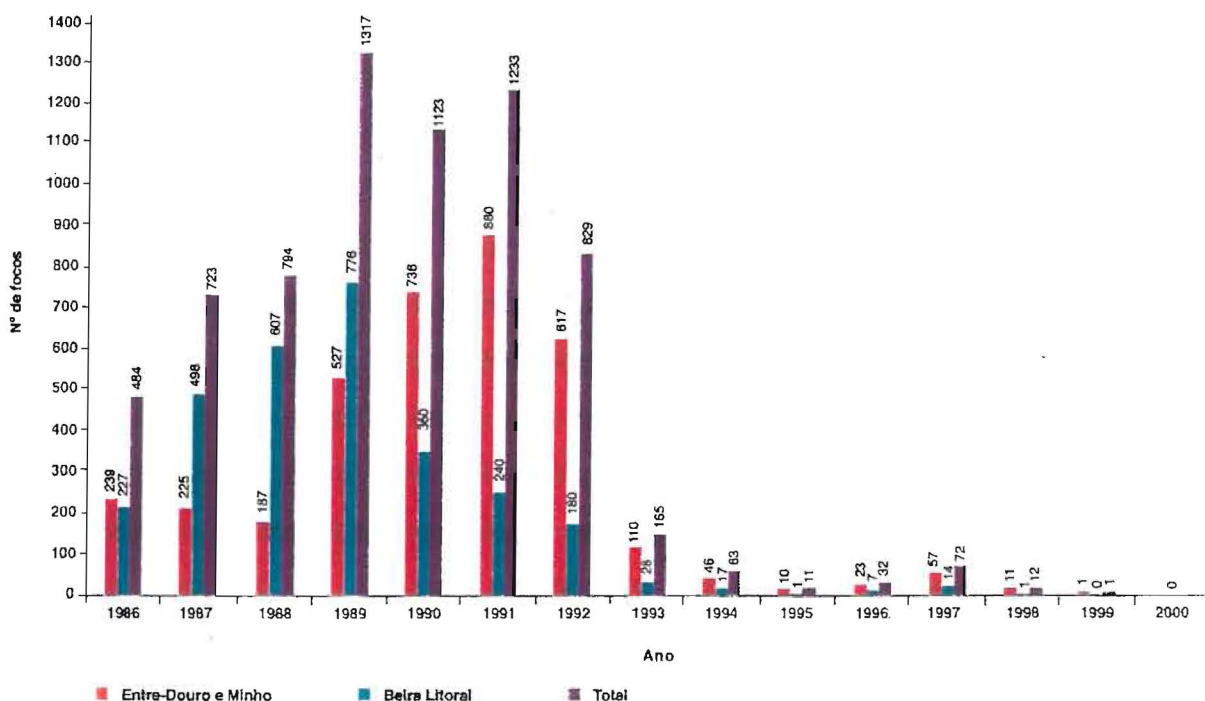
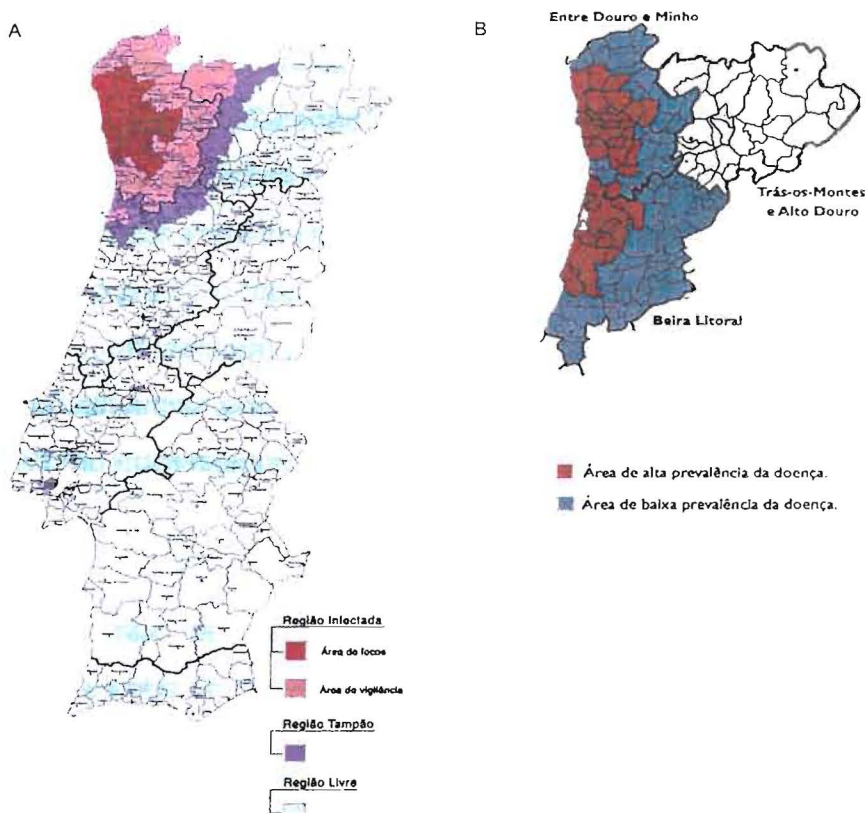
1.1- Cronologia da evolução da PPCB no Mundo desde o séc. XVIII até fins do séc. XX.

Em Portugal, onde a PPCB reapareceu em 1983, após 30 anos de suposta ausência, as zonas mais afectadas foram Entre Douro e Minho e Beira Litoral. Desde essa altura, também ocorreram infecções esporádicas em Trás-os-Montes e, raramente, na Beira Interior, Ribatejo / Oeste e Alentejo (Regalla *et al.*, 1996). Em 1985, os Serviços Veterinários implantaram um plano de erradicação, que foi revisto em 1989, com fundos da União europeia e de acordo com o qual Portugal foi dividido em três regiões: região infectada (Entre Douro e Minho e Beira Litoral), região tampão (Trás-os-Montes, Beira Interior e Ribatejo/Oeste) e região livre da doença (resto do País). Em 1998, a região infectada foi reclassificada, passando a incluir Trás-os-Montes, e subdividida em área de focos e área de vigilância (Fig. 1.2 A). A área de focos apresenta zonas de maior e menor prevalência (Fig. 1.2 B). Os bovinos de todas as explorações da região infectada são sujeitos a testes serológicos (prova da fixação do complemento - PFC) anuais (área de vigilância) ou bianuais (área de focos).

A incidência da PPCB em Portugal nos últimos anos pode ser observada na Figura 1.3.

Ao contrário do continente Africano, onde a incidência da PPCB aumentou nas áreas endémicas e surgiu em áreas até aqui indemnes, a Europa, pela primeira vez nos últimos 20 anos, não reportou qualquer foco de PPCB desde 1999 (Nicholas *et al.*, 2000), à excepção de Portugal que, nesse ano, declarou apenas um foco na região de Entre Douro e Minho (Fig. 1.3). Embora tal facto seja extremamente satisfatório e revele a eficiência da acção concertada de projectos de colaboração europeus para o controlo e diagnóstico da PPCB, ainda é cedo para se poder afirmar que este continente erradicou definitivamente a doença. As medidas de controlo não devem ser abrandadas, visto poderem existir reservatórios onde o agente etiológico esteja alojado, levando ao ressurgimento inesperado da doença.

**Figura 1.2-** A- Classificação das diferentes zonas geográficas de Portugal de acordo com a incidência de focos de PPCB em 1999; B- Prevalência da PPCB em Portugal na região infectada, área de focos (Entre Douro e Minho e Beira Litoral).



**Figura 1.3-** Incidência de focos de PPCB em Portugal entre 1986 e 2000 e, em particular, nas regiões de Entre Douro e Minho e Beira Litoral. No total estão também incluídos valores referentes a outras regiões do País de menor incidência de PPCB. Os dados foram obtidos na Direcção Geral de Veterinária.

A PPCB existe desde tempos imemoriais em muitos países Africanos, onde ainda é endémica em pelo menos 27 países das zonas equatoriais, central e Sul (Nicholas *et al.*, 2000). O número de países infectados é semelhante ao observado há 23 anos atrás. Nos últimos cinco anos houve um aumento de 20 para 27 países afectados, incluindo o Ruanda, a Tanzânia, o Botsuana, a Zâmbia, o Burundi e a Guiné, até aqui isentos. A situação de deterioração em África, devida à PPCB, levou o Grupo Consultivo da FAO/OIE/OUA, em 1998, a concluir que a PPCB podia ser considerada como a mais importante ameaça à indústria de bovinos em África.

A PPCB é difícil de detectar na sua fase inicial, não se expande imediatamente, e o seu alastramento só pode ser impedido pelo isolamento e abate dos animais doentes.

A doença pode manifestar-se sob a forma aguda, hiper-aguda e sub-aguda ou crónica (Provost *et al.*, 1987). A forma aguda é caracterizada por três fases: a fase de invasão, com sintomas ligeiros, associada a anorexia, polipneia e tosse ligeira; a fase clínica em que há hepatização dos pulmões, conduzindo a pleuresia, agravamento dos sinais clínicos, postura rígida com dorso arqueado e pescoço estendido, aumento de temperatura acompanhado de prostração do animal, respiração curta e rápida e tosse húmida com expectoração espumosa; a fase terminal em que o animal recupera lentamente da fase clínica, havendo regressão das lesões e dos sinais a elas associados. A forma hiper-aguda caracteriza-se por uma rápida evolução dos sintomas atrás descritos, ocorrendo a morte após uma semana devida a asfixia. A forma sub-aguda ou crónica é a mais comum, as lesões não são muito extensas e formam-se lesões crónicas, como os sequestros pulmonares e lesões da pleura. O animal parece ter recuperado, sendo, no entanto, portador assintomático. Em países infectados há alguns anos, a PPCB apresenta-se sob a forma crónica com casos esporádicos. Quando introduzida pela primeira vez num país ou região, tende a espalhar-se rapidamente, aparecendo vários focos em que os animais apresentam a forma aguda da doença. Nesta forma, a excreção do agente etiológico por meio de aerosóis é contínua, enquanto

que na forma crónica a excreção é menos abundante ou ausente (Provost *et al.*, 1987). A detecção de infecções crónicas é um dos principais problemas para o controlo da doença.

A prova de fixação do complemento (PFC) é recomendada pelo OIE para o rastreio serológico da PPCB, embora apresente inconvenientes e limitações relativamente à sensibilidade (falsos negativos) e especificidade (falsos positivos) (Regalla, 1995). Por este facto, em Portugal, a partir de 1998, foi introduzido o teste de *immunoblotting* (Gonçalves, *et al.*, 1998) como complemento ao rastreio serológico dos bovinos que apresentem PFC positiva ou duvidosa. A presença simultânea de cinco antigénios (110, 98, 95, 62/60 e 48 kDa) é característica de bovinos infectados. Este teste permitiu reduzir drasticamente o número de bovinos abatidos.

A utilização de vacinas, como meio de controlo da PPCB, é apenas feito em África, visto que na Europa se considerou que a vacinação interferia com o controlo serológico, não permitindo a detecção de portadores assintomáticos. A vacina utilizada nos últimos 30 anos, com resultados pouco satisfatórios e eficazes, consiste na cultura da estirpe atenuada T1/44, ou da variante resistente à estreptomicina T1/44-SR, de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Para além de produzir reacções adversas, o período de imunidade é reduzido, provavelmente devido à perda de imunogenicidade da estirpe, a aumento da virulência das estirpes de campo, ou a títulos baixos da vacina (Nicholas *et al.*, 2000). Estudos moleculares de comparação entre estirpes de campo isoladas de novos surtos em África e estirpes vacinais revelaram diferenças, mas não foi possível correlacionar estas diferenças com a maior ou menor virulência. Também não houve evidência de aquisição de factores de virulência extracromossómicos por parte dos novos isolados, nem de alteração do seu perfil antigénico, o que levou a concluir que a ineficácia podia estar relacionada com a deficiente preparação, conservação e administração da vacina (March *et al.*, 1999)

Torna-se, assim, urgente e imperioso responder ao apelo das agências internacionais de controlo da PPCB, no sentido de desenvolver uma vacinação

eficaz para a doença. Para que tal aconteça, é necessário conhecer primeiro muito bem os mecanismos genéticos da patogenicidade de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

#### 1.4- OBJECTIVOS DO PRESENTE TRABALHO

A aplicação de métodos de biologia molecular ao estudo e caracterização do agente etiológico da PPCB, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, constituiu o objectivo essencial deste trabalho. Este estudo incidiu sobre os seguintes aspectos:

- Avaliação da variação intraspecífica, relativamente à localização e número de cópias da sequência de inserção IS1296, e da utilidade dos perfis electroforéticos obtidos como marcadores epidemiológicos da PPCB. Foram analisados cerca de 100 isolados Portugueses de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.
- Desenvolvimento e avaliação de métodos de detecção de estirpes europeias e de estirpes africanas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, com base na técnica de PCR e na análise de *immunoblots*, e de um método imunológico para diagnóstico da PPCB em bovinos infectados com estirpes africanas.
- Análise sequencial e funcional de uma região do genoma de uma estirpe de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC com uma inserção adicional da sequência IS1296. Caracterização das ORF existentes, tendo em atenção a base genética de potenciais factores de virulência.
- Caracterização e diferenciação dos seis membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*" por análise dos perfis electroforéticos de RNA de baixo peso molecular, e avaliação da utilidade deste método em taxonomia molecular e no estabelecimento de relações filogenéticas.



## **2. TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS PORTUGUESES DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC COM BASE NO ELEMENTO DE INSERÇÃO IS1296**

### **2.1 - INTRODUÇÃO**

A eficácia de um plano de erradicação da PPCB depende não só do diagnóstico rápido e identificação precisa do seu agente etiológico, mas também da capacidade de diferenciação de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC de modo a detectar a origem da infecção e as suas vias de transmissão. Esta última abordagem, relativa ao estudo da variação intraspecífica, foi anteriormente efectuada através da comparação dos perfis de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) obtidos com as enzimas *Hind*III e *Kpn*I, tendo a estirpe B-675 sido diferenciada num conjunto de 11 isolados portugueses (Botelho *et al.*, 1994). No entanto, ainda que este método possa ser considerado fiável para a tipificação, a sua execução exige uma electroforese de alta resolução e a comparação dos diferentes padrões obtidos é por vezes difícil (Botelho *et al.*, 1994).

Outro método molecular, aplicável tanto a estudos epidemiológicos como filogenéticos, baseou-se na análise de polimorfismos no tamanho de fragmentos amplificados (AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*) a partir do genoma hidrolisado com endonucleases de restrição. A análise numérica dos perfis de AFLP permitiu a diferenciação de espécies de *Mycoplasma* (Kokotovic *et al.*, 1999) e de estirpes de *M. capricolum* subsp. *capripneumonia* (Kokotovic *et al.*, 2000).

As sequências de inserção (IS) têm sido utilizadas como marcadores do DNA para identificação e tipificação de estirpes bacterianas, como por exemplo em *Mycobacterium bovis* (Liébana *et al.*, 1997). Várias sequências de inserção têm sido identificadas em micoplasmas (Tabela 2.1), duas das quais em *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

**Tabela 2.1-** Sequências de inserção identificadas no género *Mycoplasma*

Sequência	Tamanho (pb)	Espécie	Nº de cópias (valor médio)	Referência
IS1221	1511	<i>M. hyopneumonia</i>	3	Ferrell <i>et al.</i> , 1989
IS1221	1519	<i>M. hyorhinis</i>	3	Ferrell <i>et al.</i> , 1989
IS	2210	<i>M. incognitus</i>	10	Hu <i>et al.</i> , 1990
iS1138	1288	<i>M. pulmonis</i>	8	Bhugra & Dybvig, 1993
IS1296	1485	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	18	Frey <i>et al.</i> , 1995
IS1296	1485	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	5	Frey <i>et al.</i> , 1995
IS1296	1485	<i>Mycoplasma</i> sp. grupo 7 bovino	2	Frey <i>et al.</i> , 1995
IS1634	1872	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	30	Vilei <i>et al.</i> , 1999

A identificação no genoma de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC de sequências de inserção fez surgir a possibilidade de desenvolver um método que permitisse o estudo da sua variabilidade intraspecífica. Nesta bactéria, a sequência de inserção IS1296, identificada por Frey *et al.* (1995), tem uma dimensão de 1485 pb, incluindo 30 pb de repetições invertidas. As duas ORF existentes, ORFA e ORFB parcialmente sobrepostas, possuem similaridades com ORF codificantes de transposases de outros IS pertencentes à família IS3. O número de cópias de IS1296 varia entre 18 e 19 no genoma de várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. O elemento de inserção IS1296 foi também detectado em *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e em *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino, mas em menor número de cópias (Frey *et al.*, 1995).

No estudo epidemiológico levado a efeito por Cheng *et al.* (1995), utilizando o elemento de inserção IS1296 (Frey *et al.*, 1995) para tipificar 64 estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC isoladas na Europa, África e Austrália durante os últimos 50 anos, observou-se polimorfismo quanto à distribuição no cromossoma deste elemento, o que permitiu a separação das estirpes em dois grupos, um europeu e outro africano/australiano. Com efeito, as estirpes isoladas desde 1980 em França, Itália, Portugal e Espanha mostraram possuir um fragmento característico de 3,4 kb, originado por hidrólise do DNA com a endonuclease de restrição *Hind*III e detectado por uma sonda baseada no IS1296 usando a técnica de *Southern blot*. Em contrapartida, as estirpes africanas apresentaram um fragmento *Hind*III de 4,4 kb, ausente nas estirpes europeias. A estirpe tipo PG1 apresentou um

padrão particular (designado por P) e ausência da banda de 3,4 kb, o que levou a incluir esta estirpe no grupo africano/australiano.

A existência de dois grupos de estirpes foi também confirmada por tipificação com o elemento de inserção IS1634 (Vilei *et al.*, 1999), específico de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. A análise da distribuição das cerca de 30 cópias de IS1634 no genoma de 22 estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, utilizando uma sonda baseada neste elemento em hibridações *Southern-blot* de DNA genómico hidrolisado com *HindIII*, revelou um padrão homogêneo relativamente às estirpes europeias. Estas estirpes possuem um fragmento característico de 7,0 kb que as diferenciou das estirpes africanas e australianas.

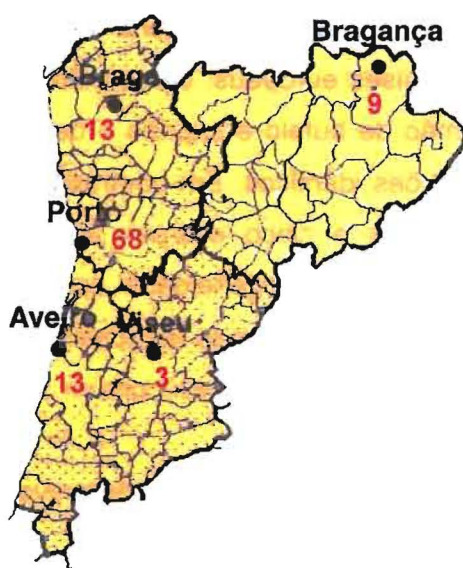
Para além da diferenciação entre estirpes de diferentes continentes, a análise do número de cópias do elemento IS1296 e da sua diferente localização no cromossoma poderá, também, possibilitar a diferenciação de estirpes de origem geográfica mais próxima. Com efeito, o estudo epidemiológico realizado por Cheng *et al.* (1995) revelou a existência de 10 padrões diferentes de IS. Com a excepção da estirpe italiana 6479, isolada de pulmão de bovino e que apresentou uma banda adicional na zona dos 6 kb, as restantes 38 estirpes isoladas em quatro países europeus, de pulmão, sêmen e lavagem prepucial de bovinos, de pulmão de búfalo e caprino e de leite de ovino (Brandão, 1995), apresentaram padrões idênticos. Em contrapartida, as 20 estirpes de 14 países africanos e cinco estirpes australianas evidenciaram sete padrões distintos. A maior heterogeneidade apresentada pelas estirpes africanas/australianas em relação às estirpes europeias foi mais notória nas estirpes vacinais, tendo, contudo, todas elas em comum a banda de 4,4 kb já referida.

Num trabalho mais recente, March e colaboradores (2000) comprovaram a grande heterogeneidade das estirpes africanas, em comparação com as europeias, e a existência de um novo biótipo. Usando sondas baseadas nos elementos de inserção IS1296 e IS1634, e analisando a sua hibridação com fragmentos de DNA genómico resultantes da hidrólise com as endonucleases *HindIII* e *EcoRI*, distinguiram entre si quatro isolados recentes de *M. mycoides*

subsp. *mycoides* SC de quatro países africanos diferentes, assim como as duas estirpes vacinais T<sub>1</sub>44 e T<sub>1</sub>SR (Clark *et al.*, 2000).

Os resultados anteriores, obtidos por outros autores, incentivaram a utilização do elemento IS1296 para tentar esclarecer a origem de surtos de PPCB em Portugal e o modo de transmissão do seu agente etiológico. Devido ao número de cópias moderadamente elevado em *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e à baixa frequência de transposição, confirmada pela análise de estirpes que sofreram muitas passagens em meios de cultura, o elemento IS1296 pareceu ser indicado para estes estudos epidemiológicos.

Entre os anos 1993 e 1998 foram isoladas em Portugal várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC durante surtos de PPCB que ocorreram em diferentes explorações localizadas, predominantemente, no Norte do País (Figuras 1.2 e 1.3), compreendendo a região de Porto, de Braga e, um pouco a Sul, de Aveiro. Um menor número de casos registou-se na região de Bragança e, ainda, no distrito de Viseu (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Origem geográfica e respectiva distribuição numérica das estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC usadas neste estudo, isoladas de surtos de PPCB ocorridos em Portugal entre 1993 e 1998.

\*\*\*

\* \* \*

O objectivo do estudo a seguir apresentado foi:

- i) Avaliar a utilidade da técnica combinada de RFLP e hibridação com sonda baseada no IS1296 para identificar diferenças genéticas entre várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, isoladas ao longo de cinco anos de bovinos pertencentes a várias explorações nacionais em que se registaram surtos de PPCB;
- ii) Analisar os resultados obtidos, apreciando possíveis inferências relativas à origem da infecção e ao seu modo de propagação.

## **2.2- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.1- Estirpes analisadas e condições de cultura**

Foram examinadas neste estudo 105 estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC pertencentes à colecção de culturas existente no Departamento de Bacteriologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária. Estas estirpes foram isoladas entre 1993 e 1998, a partir de pulmão e linfonódulos de bovinos originários de 18 explorações localizadas em cinco áreas geográficas diferentes de Portugal (Tabela 2.2). A estirpe africana Afadé e a estirpe europeia L2, incluídas nos trabalhos realizados por Cheng *et al.* (1995), foram utilizadas como referências. Os isolados foram previamente identificados como *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC pelos métodos convencionais, incluindo morfologia, testes bioquímicos e inibição de crescimento com soros hiperimunes de coelho, e por amplificação por PCR da região CAP-21 (Bashiruddin *et al.*, 1994) e do gene que codifica a proteína imunogénica P72 (Miserez *et al.*, 1996).

As estirpes foram inoculadas, a partir de culturas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , em meio B líquido (*Heart Infusion Broth* – Difco). O meio foi previamente esterilizado em autoclave 20 min a  $121^{\circ}\text{C}$ . A 100 ml de meio adicionou-se, assepticamente, 20 ml de soro de cavalo inactivado 30 min a  $56^{\circ}\text{C}$ , 10 ml de

solução de extracto de levedura a 25% p/v, 0,25 ml de solução de penicilina a 200 000 UI/ml e 1,2 ml de solução de DNA a 0,2%. As culturas foram incubadas a 37°C até uma densidade de  $10^8 - 10^9$  células/ml ( $DO_{540}=0,5-0,7$ ).

2.2.2- Preparação de DNA genómico de micoplasmas

Células de micoplasmas foram sedimentadas por centrifugação de 10 ml de cultura a 13 000 g, durante 15 min, lavadas três vezes em tampão TES (10 mM Tris.HCl pH 7,9, 0,1 mM EDTA, 140 mM NaCl) e ressuspendidas em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris.HCl pH7,9, 0,1 mM EDTA). As células foram lisadas, por incubação com 500 µl de tampão GES (5 M tiocianato de guanídio, 100 mM EDTA, 0,5% p/v sal sódico de N-lauroil sarcosina) durante 10 min à temperatura ambiente, seguida de arrefecimento em gelo e mistura com 250 µl de acetato de amónio 7,5 M, pH 7,7. Após uma incubação de 10 min no gelo, o lisado foi extraído três vezes com 500 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 saturado com tampão TE, pH 8 - Sigma P-2069). Para precipitar o DNA foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol (4°C), a mistura incubada a -75°C durante 30 min e centrifugada a 13 000 g durante 15 min a 4°C. O sedimento foi lavado duas vezes com 500 µl de etanol a 80% v/v (-20°C), seco à temperatura ambiente e o DNA ressuspendido em 100 µl de tampão TE.

Tabela 2.2–Estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC isoladas em Portugal e analisadas neste estudo

Estirpe/Ano de isolamento	Exploração/Distrito	Nº de cópias de IS1296	Padrão de IS1296 <sup>a</sup>	Estirpe/Ano de isolamento	Exploração/Distrito	Nº de cópias de IS1296	Padrão de IS1296 <sup>a</sup>
B345/93	Porto	18	E1	105/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B675/93	Mirandela/Bragança	18	E1	327/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
356/93	Mirandela/Bragança	18	E1	328/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
357P/93	Mirandela/Bragança	18	E1	340/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
358G/93	Mirandela/Bragança	18	E1	342/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
358P/93	Mirandela/Bragança	18	E1	345/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
1483/93	Aveiro	18	E1	347/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
7532P/93	Estarreja/Aveiro	18	E1	351/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
10984/93	Estarreja/Aveiro	18	E1	352/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B529/93	O. Azeméis/Aveiro	18	E1	353/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B674/93	Mirandela/Bragança	18	E1	355/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B676P/93	Mirandela/Bragança	19	E2	358/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B991/93	Aveiro	18	E1	363/97	Guimarães	18	E1



Tabela 2.2– (cont.)

Estirpe/Ano de isolamento	Exploração/Distrito	Nº de cópias de IS1296	Padrão de IS1296 <sup>a</sup>	Estirpe/Ano de isolamento	Exploração/Distrito	Nº de cópias de IS1296	Padrão de IS1296 <sup>a</sup>
B992/93	Aveiro	18	E1	372/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B994/93	Aveiro	18	E1	425/97	Viseu	18	E1
5543/94	Aveiro	18	E1	427/97	Viseu	18	E1
8883/94	Aveiro	18	E1	844/97	Barcelos	18	E1
265/95 S	Porto	18	E1	2322/97	Arouca/Porto	18	E1
265/95 G	Porto	18	E1	2329/97	Porto	18	E1
267/95 G	Porto	18	E1	2331/97	Guimarães	18	E1
268/95	Porto	18	E1	4299/97	Paredes/Porto	18	E1
333/95	Porto	18	E1	4300/97	Paredes/Porto	18	E1
331/95	Porto	18	E1	4303/97	Guimarães	18	E1
9503/96	Stº Tirso/Porto	18	E1	4306/97	Póvoa do Varzim/Porto	18	E1
10053/96	Braga	18	E1	4308/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
10055/96	Stº Tirso/Porto	18	E1	4309/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
10264/96	Murtosa/Aveiro	18	E1	4310/97	Viana do Castelo/Porto	18	E1
10269/96	Murtosa/Aveiro	18	E1	4313/97	Murtosa/Aveiro	18	E1
10278/96	Braga	18	E1	4366/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
10281/96	Braga	18	E1	5198/97	Porto	18	E1
10297/96	Stº Tirso/Porto	18	E1	5200/97	Porto	18	E1
10637/96	Vila do Conde/Porto	18	E1	5358/97	Póvoa do Varzim/Porto	18	E1
10644/96	Stº Tirso/Porto	18	E1	5364/97	Póvoa do Varzim/Porto	18	E1
10645/96	Trofa/Aveiro	18	E1	5385/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
10651/96	Fafe/Braga	18	E1	5387/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
10672/96	Braga	18	E1	6078/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
10697/96	Mirandela/Bragança	18	E1	6081/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
11069/96	Stº Tirso/Porto	18	E1	6082/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B164/96	Penafiel/Porto	18	E1	6084/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B167/96	Paredes/Porto	18	E1	6085/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B171/96	Lousada/Porto	18	E1	6087/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B541/96	Celorico de Basto/Bragança	18	E1	6090/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B723/96	Ponte de Lima/Porto	18	E1	6092/97	Stº Tirso/Porto	17	E3
B726/96	Ponte de Lima/Porto	18	E1	6094/97	Stº Tirso/Porto	18	E1
B731/96	Ponte de Lima/Porto	18	E1	6097/97	Guimarães	18	E1
B742/96	Ponte de Lima/Porto	18	E1	6147/97	Barcelos	18	E1
B743/96	Ponte de Lima/Porto	18	E1	6148/97	Barcelos	18	E1
7508/97	Barcelos	18	E1	6819/97	Viseu	18	E1
7525/97	Matosinhos/Porto	18	E1	816/98	Póvoa do Varzim/Porto	18	E1
7526/97	Matosinhos/Porto	18	E1	1670/98	Póvoa do Varzim/Porto	18	E1
7527/97	Viana do Castelo/Porto	18	E1	1672/98	Póvoa do Varzim/Porto	18	E1
7528/97	Viana do Castelo/Porto	18	E1	1674/98	Póvoa do Varzim/Porto	18	E1
2133/98	Famalicão/Porto	18	E1				
Estirpes de referência		Origem/Colecção <sup>b</sup>		Nº de cópias de IS1296		Padrão de IS1296 <sup>a</sup>	
L2		Itália/IVBBE		18		E1	
Afadé		Chade/CIRAD		18		A1	

<sup>a</sup> Designação dos padrões de acordo com Cheng *et al.* (1995). <sup>b</sup> IVBBE: Institute for Veterinary Bacteriology, Berna, Suíça; CIRAD: Campus International de Baillarguet, Montpellier, França. As zonas coloridas designam as duas estirpes que apresentaram padrões distintos.

### **2.2.3- Digestão de DNA genómico com a endonuclease *Hind*III**

A hidrólise enzimática do DNA genómico de micoplasma foi efectuada em tampão fornecido pelo fabricante (New England Biolabs), incubando aproximadamente 500 ng de DNA genómico e 20 U de *Hind*III durante 1,5 h a 37°C. Os fragmentos foram separados por electroforese horizontal em gel de agarose a 0,7% p/v com uma dimensão de 10 cm x 10 cm, durante 3 h a uma diferença de potencial constante de 90 V. Como marcador de pesos moleculares utilizou-se DNA de bacteriófago  $\lambda$  digerido com *Hind*III e marcado com digoxigenina (Boehringer Mannheim).

### **2.2.4- Preparação de sonda de DNA - IS1296 - marcada com digoxigenina**

O plasmídeo pJFFsc1a5, que contém um fragmento *Eco*RI de 828 bp duma região interna do elemento IS1296 (Frey *et al.*, 1995), foi utilizado como DNA molde para a produção de uma sonda específica marcada com digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) numa reacção de PCR com os iniciadores T3S (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') e T7S (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), complementares às sequências dos promotores T<sub>3</sub> e T<sub>7</sub> do vector pBluescript II SK(-) (Stratagene). A reacção de marcação consistiu em 100 pg de plasmídeo pJFFsc1a5 num volume de 50  $\mu$ l, contendo 10 mM Tris.HCl pH 9,0, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 170  $\mu$ M de cada dNTP, 50  $\mu$ M digoxigenina-11-dUTP, 0,25  $\mu$ M de cada oligonucleótido T3S e T7S e 2,5 U de polimerase de DNA *Taq* (Boehringer Mannheim). A reacção envolveu 35 ciclos de amplificação num termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). Cada ciclo consistiu em 30 s de desnaturação a 94°C, 30 s de hibridação a 56°C e 1 min de elongação a 72°C. O produto amplificado (sonda IS1296) tinha uma dimensão de 994 pb.

### **2.2.5- Hibridação por *Southern blotting***

A transferência de DNA do gel de agarose foi efectuada com base no método descrito por Southern *et al* (1975). Os fragmentos de DNA resultantes de digestão enzimática foram previamente clivados, para facilitar a sua



transferência, por despurinação do gel em 0,25 N HCl durante 10-15 min, a que se seguiram duas lavagens em água bidestilada. A transferência foi efectuada no aparelho *Vacuum Blotter Model 785* (Biorad), montado de acordo com as instruções do fabricante, usando como solução de transferência 0,5M NaOH/0,6 M NaCl, durante 2 h\1 sob vácuo (127 mm de Hg). Esta solução desnatura as cadeias de DNA e a aplicação de vácuo força o arrastamento dos fragmentos de DNA do gel para a membrana colocada por baixo (*Nylon membranes positively charged* – Boehringer Mannheim ou *Hybond-N* – Amersham). A posição relativa dos fragmentos no gel é, assim, reproduzida na membrana. Terminada a transferência, o filtro foi lavado duas vezes com 2x SSC (10X SSC: 1,5 M NaCl, 0,15 M citrato de sódio, pH 7,7) e os fragmentos de DNA imobilizados e desnaturados por aquecimento a 80°C, em estufa com vácuo, durante 20-30 min (Ausubel *et al.*, 1990).

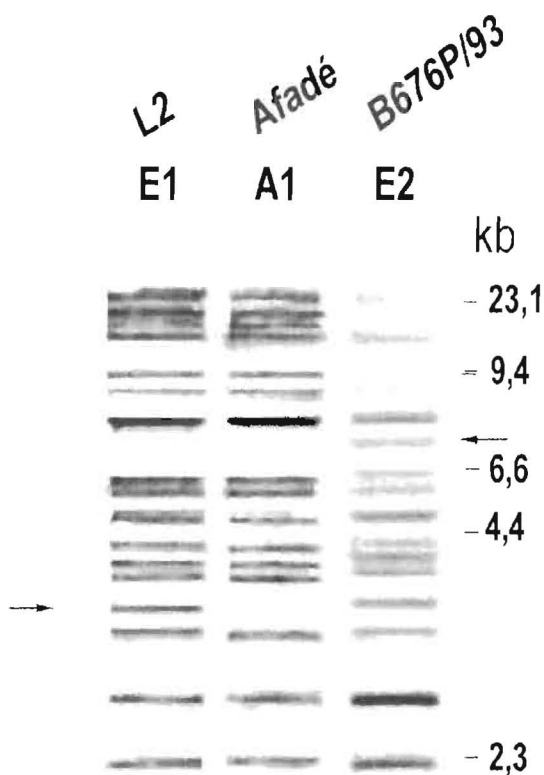
As pré-hibridações foram realizadas em volumes de 20 ml por 100 cm<sup>2</sup> de membrana e as hibridações em volumes de 3,5 ml por 100 cm<sup>2</sup> de membrana, acrescidos de 2 ml por cada membrana extra, em incubadora de hibridação rotativa Biometra OV3 a 68°C. As lavagens foram realizadas em volumes de 50 ml, à temperatura ambiente.

As membranas, humedecidas em 5X SSC, foram pré-hibridadas durante 2 a 3 h a 68° C em tampão de hibridação: 5X SSC, 0,02% SDS, 0,1% *N*-lauroil-sarcosina e 1% de reagente de bloqueio (BR - *blocking reagent*, Boehringer Mannheim). A hibridação decorreu à mesma temperatura, durante 16 a 20 h, em tampão de hibridação contendo, em 3,5 ml/100 cm<sup>2</sup> de membrana, 1 µg de sonda IS1296 marcada com digoxigenina (DIG) por incorporação de digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) preparada como descrito anteriormente e desnaturada 15 min a 100° C. As membranas foram então lavadas à temperatura ambiente, duas vezes durante 5 min com 2X SSC contendo 0,1% p/v de SDS e duas vezes durante 15 min com 0,2X SSC contendo 0,1% SDS. Seguidamente, as membranas foram colocadas 1 min em tampão (100 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) e depois incubadas à temperatura ambiente durante 30 min no mesmo tampão contendo 1% de BR. A sonda, retida na membrana por hibridação, foi detectada usando anticorpos anti-DIG (*anti-digoxigenin-AP*, *Fab fragments* - Boehringer Mannheim)

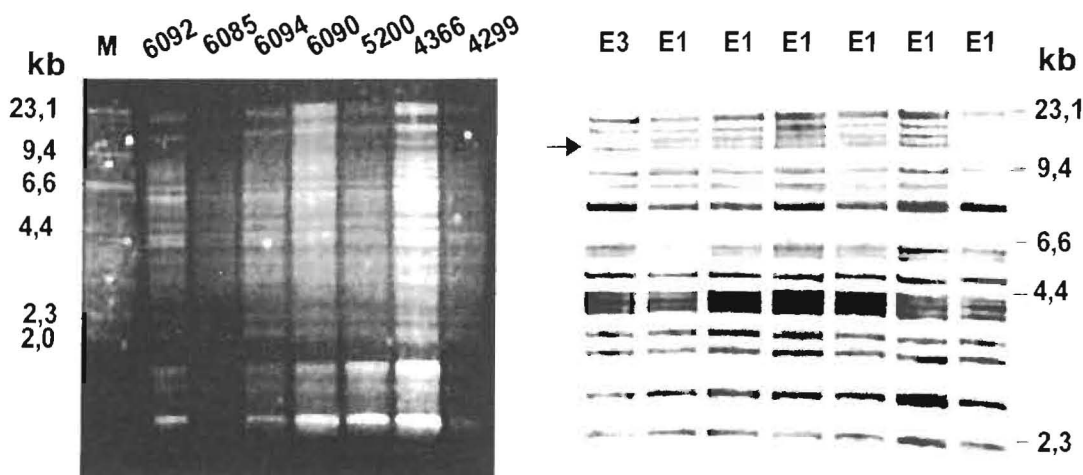
marcados com fosfatase e diluídos 1:5000 no mesmo tampão com BR, incubando-se mais 30 min à temperatura ambiente de acordo com o protocolo do fabricante. Após duas lavagens de 15 min com o mesmo tampão sem BR, lavou-se 2 min à temperatura ambiente com 100 mM Tris.HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5. A solução de revelação foi preparada com 20 ml deste tampão a que se adicionou 90 µl de NBT (*Nitroblue Tetrazolium Salt* - 75 mg/ml em DMF) e 70 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato - 50 mg/ml em dimetil formamida - DMF) (*DIG Nucleic Acid Detection Kit* – Boehringer Mannheim). Após aparecimento do sinal de hibridação parou-se a reacção lavando as membranas em água.

### 2.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos perfis de hibridação da sonda IS1296 com DNA digerido com *Hind*III das 105 estirpes portuguesas estudadas permitiu identificar três padrões distintos: E1, E2 e E3 (Tabela 2.2). A maioria das estirpes apresentou o padrão E1, sendo o padrão E2 exibido por apenas uma estirpe (B676P/93) e o padrão E3 por outra estirpe (6092/97). Estes dois últimos padrões diferem do padrão E1, comum às restantes 103 estirpes, pela presença adicional de uma banda com dimensão aproximada de 6 kb no padrão E2 (Figura 2.2), e pela ausência de uma banda na zona de 10 kb no padrão E3 (Figura 2.3). No entanto, todos os isolados portugueses, incluindo estas duas estirpes, apresentaram o padrão geral típico das estirpes europeias, representadas pela estirpe L2, uma vez que possuem a banda de 3,4 kb comum a este grupo, a qual está ausente nos perfis das estirpes africanas, representadas pela estirpe Afadé (Figura 2.2).



**Figura 2.2-** Resultado da hibridação entre a sonda IS1296 marcada com digoxigenina e os fragmentos resultantes da hidrólise com *Hind*III do DNA genômico das estirpes europeias L2 e B676P/93 e da estirpe africana Afadé. As setas indicam o fragmento adicional de 6 kb, presente na estirpe portuguesa B676P/93, e o fragmento de 3,4 kb característico das estirpes europeias e ausente nas estirpes africanas.



**Figura 2.3-** Resultado da hibridação entre a sonda IS1296 marcada com digoxigenina e os fragmentos resultantes da hidrólise com *Hind*III (imagem da direita) do DNA genômico das estirpes indicadas (imagem da esquerda). A seta indica a ausência, na estirpe 6092, de um fragmento com uma cópia da sequência IS1296 na região entre 9,4 e 23,1 kb. M- marcador de pesos moleculares  $\lambda$ DNA/*Hind*III marcado com digoxigenina.

Os dois padrões diferentes - E2 e E3 - foram originados, provavelmente, por um rearranjo no cromossoma. No caso da estirpe B676P/93 (padrão E2), possivelmente devido a um novo evento de transposição da sequência de inserção IS1296. A hipótese do padrão E2 ter resultado de uma digestão parcial foi posta de parte, visto que se efectuaram vários ensaios de hibridação de fragmentos *Hind*III, observando-se, de um modo consistente, o mesmo padrão. Em relação ao padrão E3, a ausência da banda de cerca de 10 kb poderá ser explicada pela ocorrência de uma deleção que conduziu à remoção de uma cópia da sequência de inserção IS1296 e das suas regiões cromossómicas adjacentes. A hipótese da ausência desta banda ter resultado do ganho ou da perda do local de reconhecimento específico da endonuclease *Hind*III não parece plausível, visto que não se verificou o deslocamento da banda para outro local do padrão de hibridação. A não ser que essa nova banda comigrasse com outra e, portanto, não fosse visualizada. A ausência de uma cópia de IS1296 inserida num fragmento *Hind*III com cerca de 8,5 kb foi anteriormente observada na estirpe africana M375, isolada em 1995 no Botswana (Clarck *et al.*, 2000; March *et al.*, 2000). Os autores puseram a hipótese de, evolutivamente, esta estirpe ser ancestral em relação às outras estirpes africanas estudadas. A estirpe M375 apresentou, concomitantemente, características fenotípicas relativas à morfologia, taxa de crescimento, inibição de crescimento e padrão proteico, que a distinguiram também das outras estirpes africanas.

Ambos os padrões E2 e E3 parecem ter derivado do padrão E1, comum à maioria dos isolados europeus. A manutenção prolongada das estirpes em cultura *in vitro* e o número de repicagens a que foram sujeitas não afectou a transposição do elemento IS1296, a avaliar pelos resultados dos ensaios de hibridação repetidos com várias culturas das estirpes B676P/93 e 6092. Resta saber se a multiplicação *in vivo* terá alguma influência na capacidade de transposição. As estirpes africanas isoladas na Costa do Marfim e em Burkina Faso, países onde as trocas e movimentação de gado são frequentes, apresentaram um padrão comum e diferente das estirpes isoladas nos restantes países africanos (Cheng *et al.*, 1995), o que denota a existência de uma linha clonal originada pela multiplicação de uma estirpe comum. Tudo

indica, assim, que a multiplicação *in vivo* parece também não induzir uma maior capacidade de transposição.

O padrão designado por E2, apresentado pela estirpe B676P/93 isolada em 1993 em Mirandela, distrito de Bragança, foi anteriormente encontrado apenas na estirpe europeia 6479, isolada em Itália em 1992 também de pulmão de bovino (Cheng *et al.*, 1995). Estes autores verificaram que, contrariamente ao grupo africano que apresentou sete padrões de IS diferentes em 20 estirpes analisadas, as 39 estirpes europeias, incluindo nove portuguesas, apresentaram um padrão uniforme com excepção da estirpe italiana.

É de notar que tanto a estirpe B676P/93 como a estirpe 6092 foram isoladas, juntamente com outras estirpes, de bovinos pertencentes a explorações diferentes, mas todas as outras estirpes apresentaram o padrão E1. Os padrões invulgares observados apenas nestas duas estirpes levam a supor ou uma dificuldade de propagação *in vivo* de ambas, devido à adição e à deleção de uma cópia de IS1296, ou uma dificuldade de isolamento *in vitro* que impediu que mais estirpes com o padrão E2 e E3 fossem isoladas, embora pudessem existir *in vivo*. Não é de excluir que estes dois biótipos se encontrem, assim, mais disseminados do que aparentam e possam causar PPCB. As mesmas conjecturas poderão ser alargadas à estirpe italiana 6479, que também apresentou o padrão E2, único de entre um grupo de 14 outras estirpes italianas isoladas no mesmo ano.

O material clínico de isolamento parece não estar relacionado com o padrão de IS, visto que estirpes anteriormente analisadas, isoladas de sêmen e de lavagens prepuciais de bovino, apresentaram o padrão E1 característico das estirpes isoladas de pulmão. A igual conclusão chegaram Cheng e colaboradores (1995) que, ao analisarem estirpes isoladas de caprinos e ovinos (Brandão, 1995), observaram não existir também, aparentemente, especificidade das estirpes em relação ao hospedeiro, podendo funcionar os pequenos ruminantes como reservatório de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC que infectam os bovinos.

O estudo aqui apresentado, alargando o leque de estirpes de 39 para 107, confirmou a grande homogeneidade e estabilidade do genoma das estirpes

européias. É de notar, no entanto, que todas as estirpes europeias analisadas até agora pelos vários autores, incluindo o estudo aqui apresentado, foram isoladas entre 1980 e 1998, enquanto que as africanas foram isoladas entre 1940 e 1996, período de tempo mais alargado e que permite uma análise evolutiva a longo prazo. Infelizmente, não foi possível obter estirpes europeias isoladas anteriormente a 1980.

Deste modo, o estudo epidemiológico local da região Norte de Portugal, efectuado pela caracterização do padrão de hibridação do elemento de inserção repetitivo IS1296, revelou que todas as 105 estirpes analisadas se assemelham ao grupo europeu, apresentando a esmagadora maioria o padrão E1. A baixa frequência de transposição do elemento IS1296 foi confirmada pela estabilidade do padrão E1 observada nos isolados portugueses.

A maior heterogeneidade do padrão de IS1296 apresentada pelas estirpes africanas poderá ser devida ao facto da doença ser endémica em África, desde há largos anos, e por haver maior facilidade de disseminação do agente do que na Europa devido às condições de manejo e movimentação do gado. Estes aspectos, aliados às dificuldades de diagnóstico existentes no continente Africano, impedem um melhor controlo da doença.

A tipificação de estirpes com o elemento IS1296 parece, assim, ser mais adequada a estudos epidemiológicos em África e identificação de estirpes vacinais do que a estudos epidemiológicos durante um curto período de tempo e numa área limitada na Europa. Este método de tipificação também parece ser adequado ao estudo da evolução da PPCB ao longo de várias décadas em diferentes continentes, através da pesquisa do antepassado comum do agente causal de determinados surtos.

3



### **3. DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E ANTIGÉNICA ENTRE ESTIRPES DE ORIGEM EUROPEIA E AFRICANA DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC**

#### **3.1- INTRODUÇÃO**

No decurso dos últimos anos, as observações epidemiológicas e clínicas de gado infectado com PPCB na Europa revelaram que os sintomas da doença são menos severos do que os referidos em Países Africanos. Para além deste aspecto, a PPCB parece ser mais insidiosa na Europa, visto ser normalmente crónica, o gado infectado apresentar poucos sinais clínicos evidentes e a mortalidade ser baixa (Nicholas, *et al.*, 1996).

O clima, a alimentação e o tipo de manejo dos animais poderão explicar, em parte, a severidade da doença observada em África, em comparação com o que se verifica na Europa. No entanto, para além destes aspectos, alguns resultados mostraram que estirpes europeias e africanas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC apresentam diferenças bioquímicas (Houshaymi *et al.*, 1997) e induzem respostas imunes diferentes (Abdo *et al.*, 1998) que poderão estar, também, na origem da diferente sintomatologia observada.

As respostas imune, humoral e local (traqueobrônquica), de bovinos experimentalmente infectados com antigénios das estirpes africana Afadé e europeia L2 foram analisadas através da imunodeteção (*immunoblotting*) de diferentes imunoglobulinas (Ig) e do teste de fixação do complemento (Abdo *et al.*, 1998). Foram detectadas oito proteínas imunogénicas principais, usando ambas as estirpes como antigénios e soro bovino homólogo e heterólogo. Uma proteína imunogénica de 98 kDa foi detectada na estirpe Afadé, estando ausente na estirpe L2, o que confirmou resultados anteriores (Gonçalves *et al.*, 1996). Os títulos obtidos pelo teste de fixação de complemento em soros de bovinos infectados com a estirpe africana foram 16 vezes superiores aos observados em soros de bovinos infectados com a estirpe europeia (Abdo *et al.*, 1998). Em geral, a intensidade da resposta imune foi mais alta nos animais infectados com a estirpe africana Afadé, os quais apresentaram seroconversão duas semanas após infecção, do que nos infectados com a estirpe europeia L2



que induziu reacções mais fracas e apenas três meses após a infecção. Métodos convencionais de cultura e outros baseados na técnica de PCR, para isolamento, identificação e detecção do agente infeccioso, também demonstraram que a excreção de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC ocorria muito mais cedo nos animais infectados com a estirpe Afadé do que nos infectados com a estirpe L2 (Miserez *et al.*, 1996; *idem*, 1997).

O estudo do padrão de utilização de açúcares e ácidos orgânicos por estirpes de origem europeia e africana/australiana (Houshaymi *et al.*, 1997; *idem*, 1998) revelou que as estirpes europeias não possuem oxidase de  $\alpha$ -glicerofosfato, sendo, portanto, incapazes de oxidar glicerol, no que diferem das estirpes africanas. A capacidade de oxidar o glicerol leva à produção de grande quantidade de peróxido de hidrogénio (Rice *et al.*, 2001), o que constitui um potencial factor de patogenicidade. Assim, esta característica, existente nas estirpes africanas, pode estar relacionada com a sua maior capacidade de induzir uma mais rápida e intensa resposta imune quando comparada com as estirpes europeias, o que vai originar uma maior morbilidade e mortalidade nos animais infectados (Houshaymi *et al.*, 1998). A nível molecular foi detectado nas estirpes africanas um operão constituído pelos genes *gtsA*, *gtsB* e *gtsC* os quais codificam as proteínas GtsA, GtsB e GtsC, envolvidas no transporte de glicerol através da membrana (Vilei & Frey, 2001). Este transporte, ausente nas estirpes europeias que apenas possuem o gene *gtsA*, levará a uma forte produção de peróxido de hidrogénio, resultante do metabolismo do glicerol, por parte das estirpes africanas e, por conseguinte, a uma maior capacidade de danificação das células do hospedeiro.

Os resultados anteriores, no seu conjunto, levaram a concluir que as estirpes africanas possuem, em geral, maior virulência e maior potencial imunogénico do que as estirpes europeias.

A existência de dois grupos de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, o europeu e o africano, evidenciada pelos estudos genómicos de perfis de sequências de inserção (Cheng *et al.*, 1995), foi também sugerida pelo estudo dos perfis antigénicos de diversas estirpes e por análise dos padrões de restrição do DNA com *Pst*I e *Bam*HI em que as estirpes europeias e africanas

diferiram significativamente (Poumarat & Solsona, 1994; *idem*, 1995). Neste último estudo foi possível distinguir entre si as estirpes vacinais T1 e KH3J.

Estudos posteriores, em que foram analisados os perfis antigénicos de 60 estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Gonçalves *et al.*, 1998), revelaram a existência de um antígeno dominante com uma massa molecular aparente de 70/71,5 kDa, apenas nas estirpes africanas e australianas.

A evolução diferente da PPCB nos bovinos infectados na Europa e em África, assim como as diferentes características apresentadas por estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC consoante a sua origem europeia ou africana, suportam a ideia de que o reaparecimento de surtos de PPCB na Europa a partir de 1980 não teve origem em África. Os novos surtos europeus devem ter tido outra origem, muito provavelmente num reservatório ainda não definido.

Dada a maior virulência evidenciada pelas estirpes africanas, a probabilidade de ocorrência de surtos de PPCB deste tipo na Europa representa uma ameaça ainda mais grave à bovinicultura europeia. Deste modo, métodos rápidos que permitam a diferenciação rigorosa entre as estirpes europeias e africanas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, devem ser desenvolvidos e considerados no controlo da PPCB na Europa, evitando, assim, que surtos de PPCB causados pelo tipo mais virulento de estirpes possam ocorrer sem serem detectados, alastrando rapidamente. Com efeito, devido à globalização dos mercados e ao aumento de trocas internacionais, a difusão da PPCB representa um perigo renovado e exige o desenvolvimento e implementação de programas de controlo actualizados, adequados e eficientes.

Por outro lado, será ainda muito útil dispor de um método serológico que permita diferenciar bovinos infectados com um ou outro tipo de estirpe, para que, num programa de rastreio, a infecção de bovinos com estirpes pertencentes ao grupo africano seja atempadamente detectada.

A tipificação de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC com a sequência de inserção IS1296 (Cheng *et al.*, 1995), adequada a determinados estudos epidemiológicos, tal como foi descrito no capítulo anterior, tem o inconveniente de ser um método moroso, de envolver vários passos, e de

necessitar de grande quantidade de DNA genómico purificado. Por estes aspectos, este método torna-se, assim, inadequado para analisar simultaneamente um elevado número de estirpes, não sendo o mais indicado para constituir um sistema de controlo e diagnóstico de rotina.

Na tentativa de esclarecer as bases genéticas das diferenças antigénicas encontradas entre as estirpes africanas e europeias, e obter informação sobre o mecanismo evolutivo que levou ao aparecimento de estirpes que causaram os surtos de PPCB na Europa a partir de 1980, o fragmento de 3,4 kb, que contém o elemento de inserção IS1296 e é característico das estirpes europeias, foi clonado e sequenciado (Vilei *et al.*, 2000).

A selecção deste fragmento foi feita a partir de um banco genómico, obtido por hidrólise do DNA total da estirpe europeia L2 com a endonuclease *Hind*III e clonagem no local *Hind*III do vector pBluescriptII SK (-), utilizando uma sonda derivada da sequência do elemento IS1296. O plasmídeo pJFFev3.4-L2, contendo o fragmento de 3414 pb, foi sequenciado e caracterizado (Vilei *et al.*, 2000), tendo sido demonstrado que possuía duas grelhas de leitura abertas, ORF5 e ORF2, que representavam, respectivamente, as extremidades 3' e 5' de genes truncados.

Para estudar o *locus* análogo ao fragmento *Hind*III de 3,4 kb da estirpe europeia L2 nas estirpes pertencentes ao grupo africano, amplificou-se por PCR DNA genómico da estirpe Afadé usando os iniciadores 3480bp-L e 3480bp-R, que originam um fragmento de 2,5 kb na estirpe europeia L2 (Figura 3.1). No entanto, na estirpe Afadé e em outras do grupo africano o fragmento amplificado foi de cerca de 11,3 kb. Estes resultados permitiram concluir que as estirpes europeias não possuíam aproximadamente 8,8 kb deste *locus*.

O *locus* de 11,3 kb da estirpe Afadé foi sequenciado, tendo-se confirmado a existência de um fragmento de DNA de 8,84 kb no genoma desta estirpe e ausente no genoma da estirpe L2, sendo a sequência restante de 2,5 kb idêntica em ambas as estirpes.

O fragmento de 11,3 kb da estirpe Afadé foi caracterizado (Fig. 3.1), verificando-se que continha, para além da sequência de inserção IS1296 e de uma cópia da sequência de inserção IS1634 (Vilei *et al.*, 1999), cinco grelhas de leitura abertas diferentes. Uma delas apresentava a estrutura de um gene de um péptido com uma sequência sinal típica de lipoproteínas, mas sem

homologia com qualquer outro produto conhecido (segundo a base de dados do EMBL/GenBank). Este gene, designado por *lppB*, de acordo com a proposta de nomenclatura para lipoproteínas do grupo *M. mycoides* (Monnerat *et al.*, 1999), possui seis codões UGA<sub>Trp</sub> e codifica o precursor de uma potencial lipoproteína de 622 aminoácidos. Esta lipoproteína possui um local de clivagem típico de procariontes, na sequência-sinal na extremidade N-terminal após o aminoácido na posição 23, reconhecido pela peptidase II, que permitirá a ligação da lipoproteína membranar a um lípido. Assim, foi previsto que a lipoproteína madura LppB teria 599 aminoácidos e uma massa molecular de 67,4 kDa. No fragmento de 8,84 kb, exclusivo das estirpes africanas, foram ainda identificados os genes *gstB* e *gstC*, correspondentes a, respectivamente, ORF2 e ORF3 (Figura 3.1), que codificam proteínas envolvidas no transporte de glicerol (Vilei & Frey, 2001).

Ao analisarem por *Southern blot* o DNA genómico de várias estirpes europeias de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, hidrolisado com *HindIII* e hibridado com uma sonda derivada do gene *lppB*, Vilei *et al.* (2000) comprovaram que este gene não existia noutra local do cromossoma dessas estirpes. Semelhante estudo permitiu comprovar a existência de uma cópia única do gene *lppB* nas estirpes africanas testadas pelo mesmo método, nas quais se observaram os fragmentos de DNA previstos de 0,4, 1,0 e 3,9 kb, visto o gene *lppB* conter dois locais de reconhecimento pela endonuclease *HindIII*.

\* \* \*

Com base no resultado da sequenciação e análise do *locus* de 11,3 kb amplificado a partir do DNA da estirpe africana Afadé, o qual contém o fragmento de 8841 pb que está ausente nas estirpes europeias (Vilei *et al.*, 2000), o estudo apresentado no presente capítulo teve por finalidade:

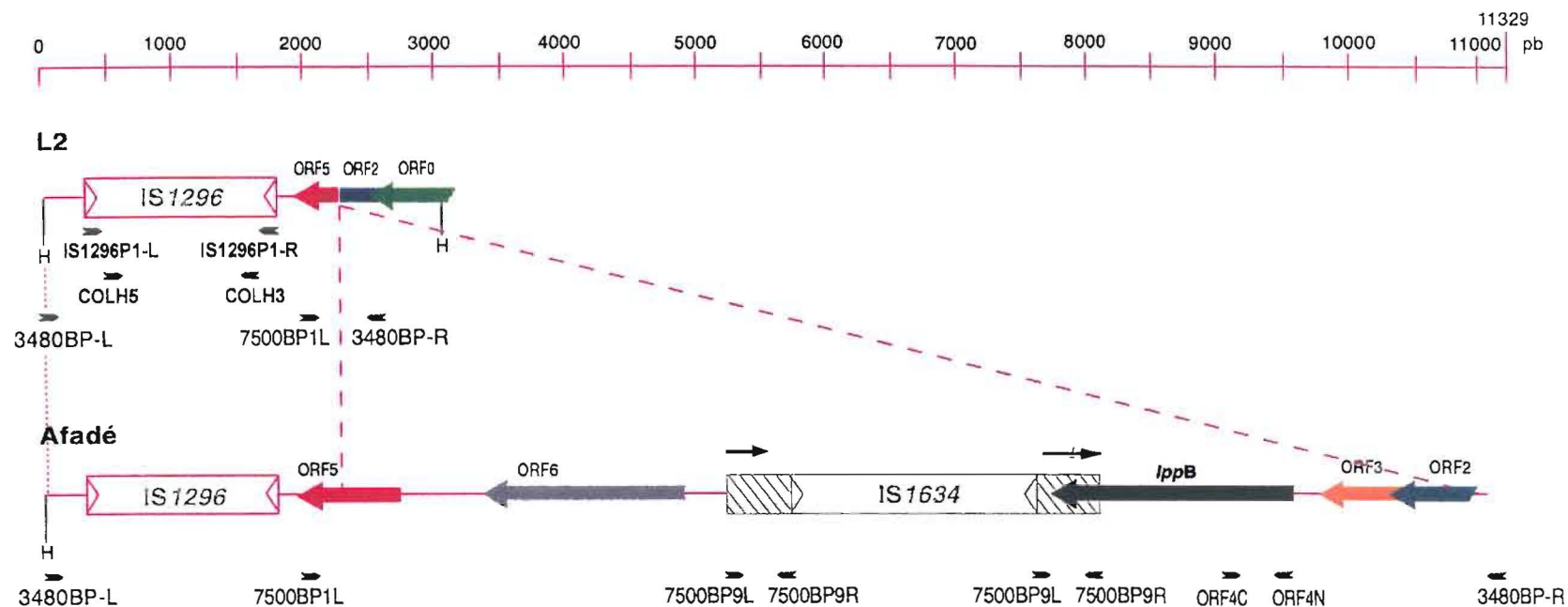
- i) Diferenciar rápida e eficientemente estirpes europeias de estirpes africanas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, desenvolvendo um método baseado na técnica de PCR.
- ii) Distinguir bovinos infectados com estirpes do grupo europeu de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC de bovinos infectados com estirpes do grupo africano, desenvolvendo um método de imunodeteção.

### 3.2- MATERIAIS E MÉTODOS

Quando não detalhados e referenciados, os métodos convencionais utilizados em Biologia Molecular foram executados de acordo com protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1990).

#### 3.2.1- Estirpes analisadas e condições de cultura

Um total de 99 estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, listadas na Tabela 3.1, foi utilizado neste estudo em que foram incluídas, para além da estirpe tipo PG1, 84 estirpes europeias, das quais 79 isoladas em Portugal entre 1991 e 1998, 12 estirpes africanas e 2 estirpes australianas. As estirpes foram inoculadas, a partir de culturas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , em meio B líquido (*Heart Infusion Broth* – Difco). O meio foi previamente esterilizado em autoclave (20 min a  $121^{\circ}\text{C}$ ), sendo depois adicionados a 100 ml de meio, assepticamente, 20 ml de soro de cavalo inactivado durante 30 min a  $56^{\circ}\text{C}$ , 10 ml de solução de extracto de levedura a 25% p/v, 0,25 ml de solução de penicilina (200 000 UI/ml) e 1,2 ml de solução de DNA a 0,2%. As culturas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  até uma densidade de  $10^8 - 10^9$  células/ml ( $\text{DO}_{540}=0,5-0,7$ ).



**Figura 3.1-** Mapa genético da região do genoma de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC que contém o gene *lppB*. Esta região diferencia as estirpes europeias (representadas pela estirpe L2), das estirpes africanas (representadas pela estirpe Afadé). As caixas abertas indicam cópias dos dois elementos de inserção IS1296 e IS1634. No segmento de 8,84 kb específico da estirpe Afadé, as caixas riscadas representam as repetições directas de 478 pb do elemento de inserção IS1634. As setas grandes indicam ORFs. As posições dos iniciadores oligonucleotídicos utilizados (ver Tabela 3.2) estão assinaladas por setas pequenas (Adaptado de Vilei *et al.*, 2000).

**Tabela 3.1–** Estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC utilizadas neste estudo

Estirpe	Origem/Colecção	Ano isolamento	Hospedeiro	Produto PCR † (kb)	Produto PCR ‡ (kb)
PG1 <sup>†</sup>	NCTC	1931	Bovino	9,3	0,3+2,65
L2 <sup>R</sup>	Itália/IVBBE	1992	Bovino/pulmão	0,45	---
B773/125	Portugal/LNIV	1991	Bovino/sémen	0,45	---
B421	Portugal/LNIV	1993	Bovino/pulmão	0,45	---
B675	Portugal/LNIV	1993	Bovino/pulmão	0,45	---
7529P	Portugal/LNIV	1993	Bovino/pulmão	0,45	---
B345	Portugal/LNIV	1993	Bovino/líquido pleural	0,45	---
C305	Portugal/LNIV	1993	Caprino/pulmão	0,45	---
O326	Portugal/LNIV	1993	Ovino/leite	0,45	---
268	Portugal/LNIV	1995	Bovino/pulmão	0,45	---
10297	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
9503	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
10269	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
751	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
1348	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
1347	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
1566	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
1559	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
11069	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
2886	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
10644	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
2887	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
10055	Portugal/LNIV	1996	Bovino/pulmão	0,45	---
425	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
105	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
347	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
2329	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
327	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
427	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6092	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
844	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4300	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
372	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
340	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
351	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
342	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
353	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
363	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6087	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6097	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6085	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6082	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6078	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6094	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6084	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6147	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
7511	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
7528	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
7508	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
7525	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
7526	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
7527	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---

Tabela 3.1– (cont.)

Estirpe	Origem/Colecção	Ano isolamento	Hospedeiro	Produto PCR † (kb)	Produto PCR ‡ (kb)
6081	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6090	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6092	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
5387	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
5358	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
5385	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4309	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4306	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
5198	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
5200	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
5364	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4299	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4308	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4303	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4366	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
4313	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
6148	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
358	Portugal/LNIV	1997	Bovino/pulmão	0,45	---
816	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
1670	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
1672	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
1674	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
749	Portugal/LNIV	1998	Bovino/lavagem peripucial	0,45	---
2473	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
2481	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
2966	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
1670	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
2957	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
258	Portugal/LNIV	1998	Bovino/pulmão	0,45	---
PO 2	França/CIRAD	1980	Bovino/pulmão	0,45	---
2059	Espanha/LPB	1984	Bovino/pulmão	0,45	---
2022	França/LPB	1984	Bovino/pulmão	0,45	---
6479	Itália/LPB	1992	Bovino/pulmão	0,45	---
Afadé <sup>R, I</sup>	Chade/CIRAD	1968	Bovino/pulmão	9,3	0,3+2,65
KH3J	Sudão/CIRAD	1940	Bovino/estirpe vacinal	9,3	0,3+2,65
T1/44	Tanzânia/CIRAD	1952	Bovino/estirpe vacinal	9,3	0,3+2,65
T1/Sr50	Tanzânia/CIRAD	1952	Bovino/estirpe vacinal	9,3	0,3+2,65
B17	Chade/CIRAD	1967	Zebu	9,3	0,3+2,65
Dakar 2144	Senegal/CIRAD	<1968	Bovino	9,3	0,3+2,65
2162	Senegal/CIRAD	<1968	Bovino	9,3	0,3+2,65
Fatick	Senegal/CIRAD	1968	Bovino	9,3	0,3+2,65
Gemu Goffa	Etiópia/CIRAD	1974	Bovino	9,3	0,3+2,65
87137-9	Burkina Faso/CIRAD	1987	Bovino	9,3	0,3+2,65
Filfil	Senegal/CIRAD	<1988	Bovino	9,3	0,3+2,65
94111	Ruanda/CIRAD	1994	Bovino	9,3	0,3+2,65
V5	Austrália/IVBBE	1965-68	Bovino/estirpe vacinal	9,3	0,3+2,65
Gladysdale	Austrália/NCTC		Bovino	9,3	0,3+2,65

<sup>†</sup> Estirpe tipo; <sup>R</sup> Estirpes de referência representantes do grupo europeu e africano; <sup>I</sup> Isolada no Chade de um bovino oriundo de Afadé, Camarões. Colecções: LNIV, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa, Portugal; CIRAD, CIRAD-EMVT, Montpellier, França; NCTC, National Collection of Type Cultures, PHLS, Londres, Reino Unido; IVBBE, Institute for Veterinary Bacteriology, Berna, Suíça; LPB, Laboratoire de Pathologie Bovine, Lyon, França. † Tamanho do fragmento obtido por PCR usando os iniciadores 7500BP1L e 3480BPR (Figura 3.1);

‡ Tamanho do fragmento obtido por PCR usando os iniciadores 7500bp9L e 7500bp9R (Figura 3.1)



### **3.2.2- Preparação de DNA genómico para hibridação *Southern-blot***

Esta preparação foi feita de acordo com o descrito no Capítulo 2 (2.2.2).

### **3.2.3- Preparação de DNA genómico para PCR**

As células de micoplasmas foram sedimentadas, por centrifugação de 1 ml de cultura de micoplasma em meio B a 10 000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415 D, durante 15 min, e ressuspendidas em 200 µl de tampão TNE (0,01 M EDTA, 0,01 M Tris.HCl pH 8,0, 0,01 M NaCl) contendo 1% p/v SDS e 1% p/v Sarcosil. Adicionou-se 20 µl de proteinase K (20 mg/ml) e incubou-se 1 h a 37°C e depois 15 min a 56°C. O lisado foi extraído uma vez com 200 µl de fenol saturado com tampão TE e duas vezes com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado com 20 µl de 3 M acetato de sódio e 400 µl de etanol absoluto frio, colocando-se a mistura durante a noite a -20°C. Após centrifugação a 10 000 rpm durante 5 min, o sedimento de DNA foi lavado com 200 µl de 70% v/v etanol frio, seco 1 h ao ar e ressuspendido em 20 µl de água bidestilada para se proceder de seguida à sua quantificação e determinação da pureza.

### **3.2.4- Amplificação de DNA genómico por PCR**

Dois pares de iniciadores foram desenhados com base na comparação da sequência de 2,5 kb da estirpe L2 com a sequência de 11,3 kb da estirpe Afadé, ambos produtos resultantes da amplificação por PCR com os iniciadores 3480BP-L e 3480BP-R. A localização dos iniciadores encontra-se indicada na Fig. 3.1, e as suas sequências e respectivas temperaturas de emparelhamento apresentadas na Tabela 3.2.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc.), em misturas de reacção de 50 µl contendo 1x tampão de reacção (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris.HCl, pH 9,0), 170 µM de cada dNTP, 250 nM dos iniciadores (7500BP1L e 3480BP-R ou 7500BP9L e 7500BP9R), 1,25 unidades de enzima polimerase de DNA *Taq* (5U/µl) (Pharmacia) e 500 ng de DNA-molde. As amostras foram sujeitas a 35 ciclos

de amplificação, consistindo cada ciclo em desnaturação a 94°C durante 30 s, hibridação a 52°C durante 30 s e elongação a 72°C durante 30 s.

**Tabela 3.2–** Iniciadores utilizados em reacções de PCR

Designação	Sequência	Temperatura de emparelhamento
7500BP1L	5' GTTGGTTTTGGATCAACTGG 3'	52°C
3480BP-R	5' GCACCAAATGAAGCTAATAGAACA 3'	52°C
7500BP9L	5' TTGAGATAATAATGTATCTGC 3'	48°C
7500BP9R	5' AAGTTGTAATAAGAAACAG 3'	48°C

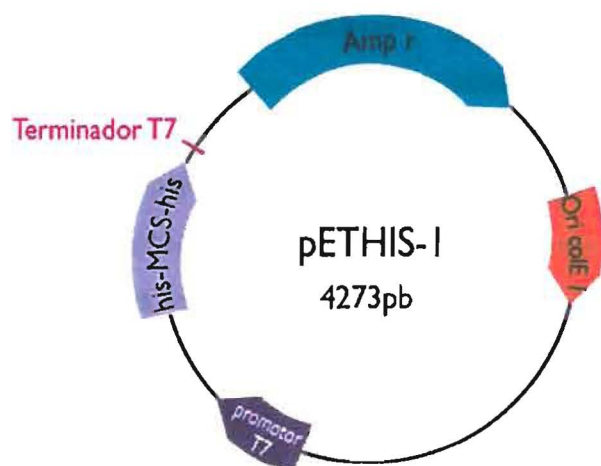
Para amplificação de fragmentos longos de DNA (> 3 kb), as condições de amplificação foram alteradas de modo que 50 µl de mistura de reacção continha 1 x tampão de reacção [50 mM Tris.HCl, pH 9,2, 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 350 µl de cada dNTP, 300 nM de cada iniciador, 1,75 unidades de mistura de polimerase de DNA *Taq* e polimerase de DNA *Pwo* com elevada processividade (*Expand Long Template PCR System kit*, Boehringer Mannheim), e 500 ng de DNA-molde.

Para determinar a concentração adequada de magnésio, foram preparadas misturas de reacção com diferentes concentrações de cloreto de magnésio: 1,75 mM, 2 mM, 2,25 mM com e sem SDS, 3 mM, 3,5 mM e 4 mM. Após desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, as amostras foram sujeitas a 25 ciclos de amplificação em que os 10 primeiros ciclos consistiram em 10 s a 94°C, 30 s a 52°C e 6 min a 68°C, seguindo-se 15 ciclos idênticos na desnaturação e hibridação, mas em que a elongação a 68°C foi prolongada mais 20 s em cada ciclo. Um último ciclo de elongação a 68°C durante 7 min foi adicionado.

### 3.2.5- Expressão da região N-terminal da proteína LppB

Os iniciadores ORF4C e ORF4N (Figura 3.1), contendo prolongamentos para reconhecimento das enzimas de restrição, respectivamente, *Bam*HI e *Kpn*II, foram utilizados para amplificar a região 5' terminal do gene *lppB*, que codifica a região N-terminal (aminoácidos 43 a 338) da proteína LppB (Figura 3.1). Esta região foi escolhida por não conter codões UGA<sub>trp</sub> que conduzem a uma paragem na tradução ao serem lidos como codões de finalização pela

estirpe *Escherichia coli* Epicurian Coli BL21(DE3) (Stratagene), genótipo: BF-*dcm ompT hsdS* ( $r_B^- m_B^-$ ) *gal*  $\lambda$ (DE3). O produto amplificado foi ligado aos locais de restrição enzimática *KpnI* – *BamHI* do *Multiple Cloning Site* (MCS) do vector de expressão pETHIS-1 (Schaller *et al*, 1999) (Figura. 3.2), o qual foi construído a partir do vector pET14b (Novagen) por adição de um MCS e de uma região que codifica uma extensão de 10 histidinas localizadas na extremidade C-terminal, para além das seis já existentes na extremidade N-terminal. Assim se obteve o plasmídeo pJFFLppB-His (Vilei *et al.*, 2000) que inclui a região codificante da parte N-terminal (38,2 kDa) da proteína LppB, com extensões de seis histidinas na extremidade N-terminal e de 10 histidinas na extremidade C-terminal (*poli-histidine tags*), e que foi utilizado para transformar células da estirpe Epicurian Coli BL21(DE3).

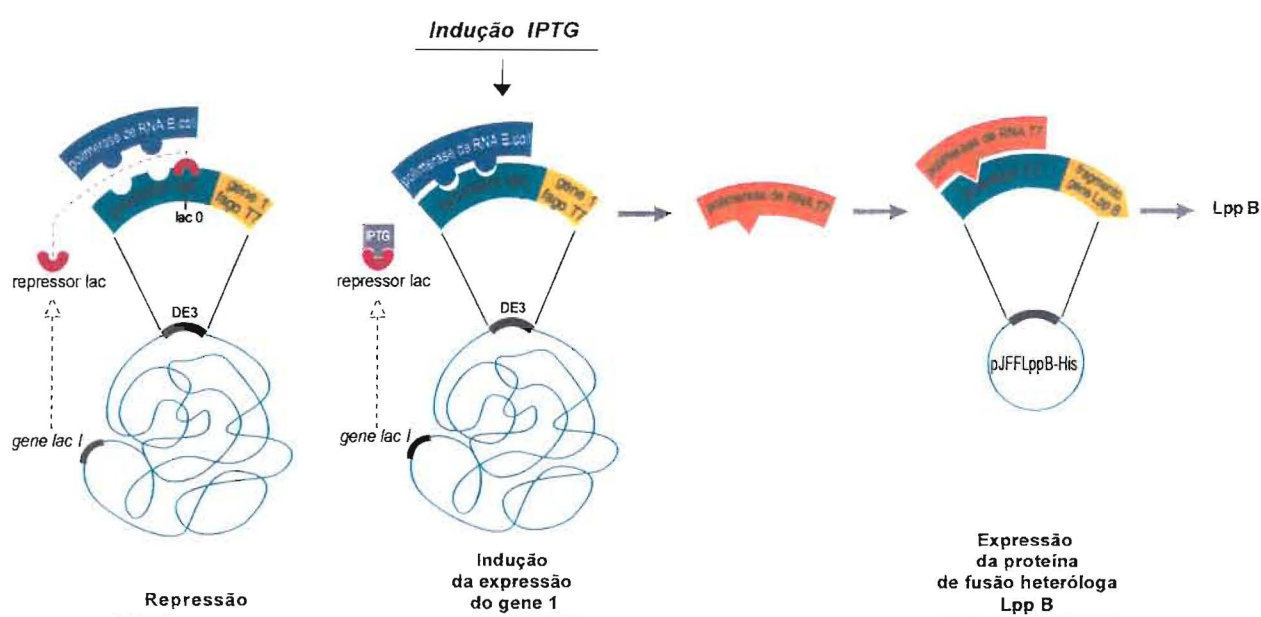


**Figura 3.2-** Representação esquemática do vector pETHIS-1, com os seus elementos reguladores mais importantes (promotor T7 e terminador T7) e genes inscritos. Amp<sup>r</sup>, resistência à ampicilina.

Nos vectores pET a expressão bacteriana *in vitro* é promovida pelo promotor fágico T7 (Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990), para cuja sequência de reconhecimento a polimerase de RNA do bacteriófago T7, expressa pela estirpe de *E. coli* BL21(DE3), apresenta alta selectividade. A expressão da polimerase de RNA do bacteriófago T7 na estirpe lisogénica BL21(DE3) é feita a partir do promotor *lacUV5* e do *gene 1* do fago T7 que codifica esta polimerase e se encontra inserido no cromossoma desta estirpe (Figura 3.3). Na presença do indutor IPTG, que se liga ao repressor *lac* codificado pelo gene *lac I*, impedindo que este se ligue ao operador *lac* e

bloqueie a transcrição do *gene 1*, a polimerase de RNA de *E. coli* pode ligar-se ao promotor *lacUV5* e o *gene 1* é transcrito e depois traduzido em polimerase de RNA T7.

Ao clonar o segmento codificante do fragmento da proteína a jusante do promotor T7 e do *gene 10* do fago T7, que possui os sinais de ligação ao ribossoma (RBS – *Ribosome Binding Site*) e que inclui a sequência sinal Shine-Dalgarno localizada 5-13 nucleótidos a montante do codão de iniciação da tradução ATG, assegura-se alta eficiência de tradução.



**Figura 3.3-** Representação esquemática do controlo da expressão da proteína de fusão recombinante LppB-His na célula hospedeira de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pJFFLppB-His.

Células competentes de *E. coli* BL21(DE)3 foram transformadas com o plasmídeo pJFFLppB-His adicionando 10 ng de DNA plasmídico (10 a 25 µl) a 100 µl de células, retiradas directamente de -70°C para gelo e incubadas no gelo durante 20 min. Seguidamente foi dado um choque térmico de 2 min a 42°C em banho de água. Colocou-se a mistura 2 min em gelo e incubou-se durante 1 h a 37°C, com agitação a 250 rpm, após adição de 1 ml de meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) contendo 1% p/v bacto-triptona, 0,05% extracto de levedura e 1% NaCl. Diluições das células transformadas foram

inoculadas em placas de Petri com meio LB contendo 1,5% de Bactoagar e suplementado com ampicilina (50 µg/ml). A selecção das células transformadas com vector recombinante foi feita por resistência ao antibiótico ampicilina, conferida pelo vector.

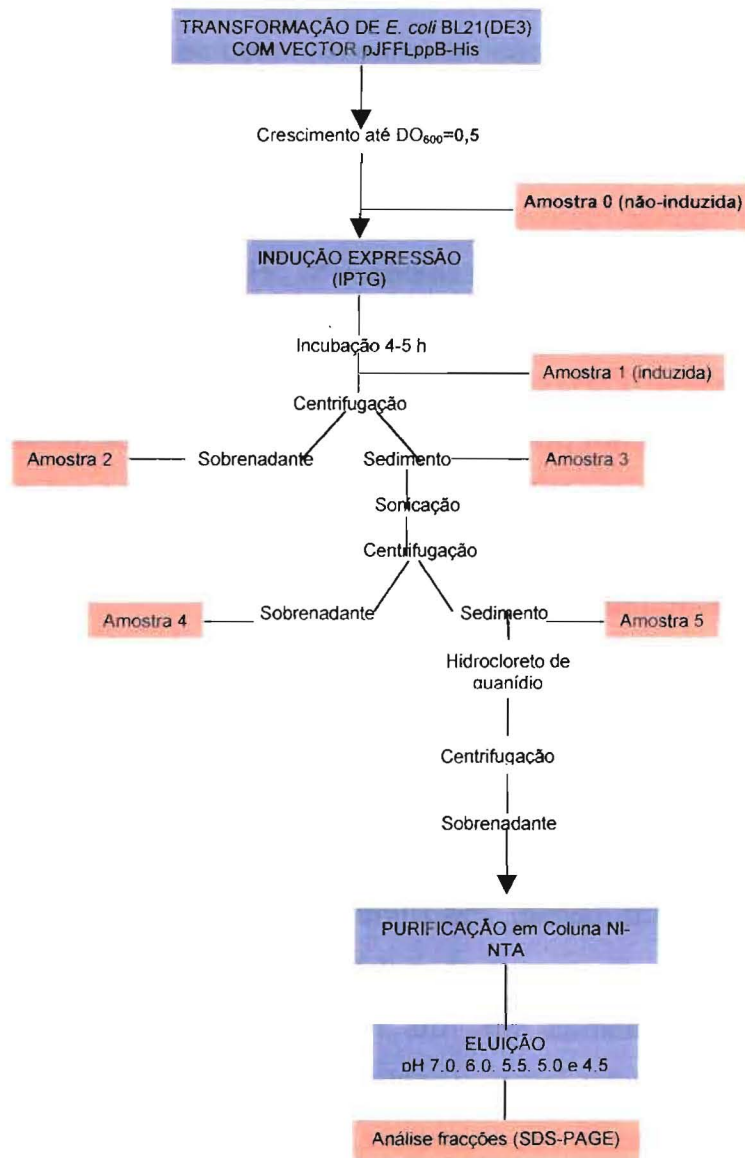
Um clone positivo foi inoculado em 10 ml de meio líquido LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubado a 37°C durante a noite. A cultura foi então transferida para 50 ml de meio LB líquido com ampicilina e incubada a 37°C com agitação vigorosa até atingir  $DO_{600} = 0,5$ . Nesta altura, induziu-se a expressão da proteína recombinante adicionando 1M IPTG, para uma concentração final de 10 mM, e continuou-se a incubação por mais 4 h. As células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 g durante 10 min a 4°C, ressuspendidas em 5 ml de tampão PN (50 mM  $NaH_2PO_4$  pH 8, 300 mM NaCl) e sonicadas no gelo a 200-300 W, seis vezes 10 s, com intervalos de 10 s. Centrifugou-se a 15000 g a amostra sonicada, durante 20 min a 4°C. O sobrenadante contendo a fracção citosólica foi guardado e o sedimento constituído por detritos celulares (fracção insolúvel) foi ressuspendido em 10 ml de tampão PN. A 5 ml desta fracção adicionou-se hidrocloreto de guanídio para uma concentração final de 6 M e incubou-se durante a noite a 4°C, com agitação a 200 rpm. A suspensão foi centrifugada a 3000 g durante 15 min a 4°C e retirou-se uma alíquota de 500 µl do sobrenadante à qual se adicionaram 500 µl de tampão PNG (50 mM  $NaH_2PO_4$  pH 8, 300 mM NaCl, 6M hidrocloreto de guanídio), para análise electroforética. O restante sobrenadante foi utilizado para purificação.

O processo de expressão e purificação encontra-se esquematizado na Figura 3.4.

As alíquotas das várias amostras obtidas durante o processo de indução da expressão foram analisadas por electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS/PAGE) (Laemmli, 1970). Verificou-se, assim, a presença da proteína de fusão induzida no sedimento da amostra sonicada (fracção insolúvel), pelo que se adicionou hidrocloreto de guanídio para se poder proceder à sua purificação em condições desnaturantes.

Este processo, feito inicialmente à escala reduzida para determinar a localização da proteína de fusão expressa, foi depois ampliado para obtenção

de maior quantidade de proteína, sendo utilizada uma cultura de 500 ml de células BL21(DE3) transformadas com pJFFLppB-His.



**Figura 3.4-** Esquema do processo de expressão e purificação da proteína de fusão Lpp- His

### 3.2.6- Purificação da região N-terminal da proteína LppB

Visto a proteína expressa possuir nas extremidades N-terminal e C-terminal poli-histidinas, a purificação foi feita por cromatografia de afinidade através de coluna de níquel.

À amostra, correspondente à proteína desnaturada com hidrocloreto de guanídio, foi adicionado 1 ml de agarose de níquel/ácido nitrilotriacético (Ni-

NTA agarose – Quiagen), sendo a mistura agitada a 200 rpm durante 60 min à temperatura ambiente. Esta mistura foi colocada numa coluna preparada com 2,5 ml de agarose Ni-NTA, pré-lavada com 10 ml de água bidestilada, 2 ml de 6 M hidrocloreto de guanídio, 0,2 M ácido acético e equilibrada com 10 ml de tampão PNG. Após colocação da amostra, lavou-se novamente a coluna com 30 ml de tampão PNG pH 8. A proteína foi eluída com 10 ml de tampão PNG a valores decrescentes de pH (7,0, 6,0, 5,5, 5,0 e 4,5), sendo recolhidas fracções de 1 ml. As fracções foram dialisadas em manga de diálise (15 000 MWCO - *Molecular Weight Cut Off*), em tampão PN, pH 8, durante a noite a 4°C, para eliminação do hidrocloreto de guanídio, e analisadas por electroforese de gel de poliacrilamida a 12,5% com SDS.

A concentração em proteína das diferentes fracções foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando como padrão uma solução de albumina bovina (BSA) a 0,5 mg/ml, e efectuando as leituras da absorvência a 660 nm ( $A_{660}$ ) em espectrofotómetro Shimadzu UV-1203.

### **3.2.7- Produção de antígenos**

O meio de Gourley modificado (2,5% *Heart Infusion broth*, 0,25% neo-peptona, 0,25% Bacto-casitona, 0,2% glucose, 2,5% extracto de levedura fresco, 15% soro de cavalo, 250 UI/ml de penicilina, pH 7,6), esterilizado por filtração em filtros de poro 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$ , foi utilizado para a cultura das estirpes de micoplasmas em 100 ml, a 37°C, até à fase exponencial de crescimento. As células foram recolhidas por centrifugação a 14 600 g, durante 60 min a 4°C, e lavadas três vezes em 25 ml de tampão fosfato salino (PBS – 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,15 M NaCl, pH 7,2). As células lavadas foram ressuspensas no mesmo tampão, num volume 100x inferior ao volume inicial de cultura, e conservadas a -20°C em volumes de 50  $\mu\text{l}$  a 100 $\mu\text{l}$ .

As concentrações proteicas das suspensões foram determinadas pelo método de Lowry *et al.* (1951).



### 3.2.8- Produção de anticorpos policlonais monospecíficos em coelhos

Este tipo de anticorpos, dirigidos contra a proteína recombinante LppB com extensões de poli-histidinas, foram obtidos por imunização de três coelhos (cujos soros deram resultado negativo na prova de fixação do complemento com o antígeno da estirpe B103 de *M. mycoides* subsp. *mycoides*) através de injeção intramuscular de 50 µg desta proteína por kg de peso animal, misturada com adjuvante completo de Freund (Difco) numa proporção 1:1. Processo idêntico repetiu-se 21 dias depois, utilizando adjuvante de Freund incompleto (Difco) e novamente passados outros 21 dias, mas desta vez por injeção endovenosa na veia marginal da orelha, sem adjuvante. A injeção endovenosa foi repetida mais duas vezes com intervalo de 72 h. Os coelhos foram sangrados sete dias após a última injeção endovenosa.

Os soros hiperimunes foram preparados a partir das amostras de sangue incubadas 30 min à temperatura ambiente e 2 h em gelo. O soro foi recolhido, após centrifugação duas vezes a 2000 g durante 25 min a 4°C, titulado, distribuído por alíquotas e conservado a -20°C.

Foram ainda utilizados soros hiperimunes de coelho anti-estirpe africana Afadé e anti-estirpe europeia B103 e soros de infecções naturais em bovinos, produzidos e existentes no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, assim como soro de bovino experimentalmente infectado com a estirpe africana Afadé, cedido pelo Institute for Veterinary Bacteriology da Universidade de Berna.

### 3.2.9- Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para análise das diferentes fracções proteicas obtidas durante o processo de expressão e purificação da proteína heteróloga, adicionou-se a cada alíquota igual volume de tampão de lise (0,5 M Tris.HCl, 4,6 % p/v SDS, 20% v/v glicerol, 10% v/v 2-beta-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol, pH 6,8) e procedeu-se a uma desnaturação a 100°C durante 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de 1,5 mm de espessura, a 12,5% na zona de separação [30%/0,8% acrilamida/bisacrilamida BIORAD - 12,5 ml, 3 M Tris.HCl, pH 8,8 - 3,75 ml,



10% p/v SDS - 300 µl, 1,5% p/v persulfato de amônio (APS) - 1,5 ml, N,N,N',N' – tetrametilenodiamina (TEMED) – 15 µl] e 4,5% na zona de concentração (30%/0,8% acrilamida/bisacrilamida - 1,25 ml, 0,5 M Tris.HCl, pH 6,8 – 2,5 ml, 10% SDS - 100 µl, 1,5% APS - 500 µl, TEMED – 5 µl).

A separação das proteínas foi feita a uma corrente constante de 40 mA, de acordo com o sistema de Laemmli (1970), em equipamento de electroforese vertical (Hoefer, SE 600) com tampão electrolito 1x (0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 0,1% SDS, pH 8,3), seguida de coloração em solução de azul de Coomassie (2,5% p/v *Coomassie Brilliant Blue* R-250, 45 % v/v metanol, 10% v/v ácido acético) e descoloração em solução de 50 % v/v metanol e 10% v/v ácido acético.

Os pesos moleculares das proteínas foram determinados por comparação da sua mobilidade relativa com proteínas de peso molecular conhecido que funcionaram como marcadores: fosforilase b - 97 kDa, albumina bovina - 66 kDa, ovalbumina – 45 kDa, anidrase carbónica – 30 kDa, inibidor da tripsina – 20,1kDa,  $\alpha$ -lactalbumina – 14,1 kDa (LMW – Pharmacia); tiroglobulina – 669 kDa, ferritina – 440 kDa, catalase – 232 kDa, lactato-desidrogenase – 140 kDa, albumina bovina – 66 kDa (HMW - Pharmacia).

Para posterior transferência, a separação das proteínas totais das suspensões de células de micoplasmas foi feita igualmente em SDS-PAGE, usando 20 µg de proteína mas utilizando um gel de concentração a 4,5% e de separação com gradiente a 5-15%.

### **3.2.10- Transferência de proteínas e imunomarcacão (*Western-blot*)**

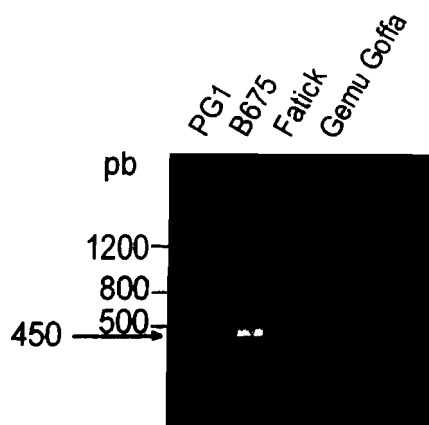
As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de poro (Schleicher & Schuell BA85 ou Whatman 7031 4502), a uma diferença de potencial constante de 70 V durante 1h 30 min (Towbin *et al.*, 1979) num aparelho de transferência (*Transphor blotting* - Hoefer) com tampão de transferência (0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 20% v/v metanol, pH 8,3).

As membranas foram bloqueadas à temperatura ambiente durante 2 h, em tampão PBS contendo 1 M glicina, 1% p/v ovalbumina e 5% p/v leite desnatado, e incubadas com soro hiperimune de coelho a 37°C com agitação durante 2 h. Após três lavagens sucessivas de 15 min cada à temperatura ambiente em PBS com 0,1% (v/v) Tween 20 e uma lavagem de 10 min em PBS, as membranas foram incubadas 1 h à temperatura ambiente com imunoglobulinas G (IgG) de ovelha, cadeias pesadas e leves, anti-coelho conjugadas com peroxidase (The Binding Site) e diluídas de acordo com as indicações do fabricante. Após lavagem como descrito anteriormente, o sinal foi revelado adicionando o substrato (30 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvido em 10 ml de metanol, 50 ml de PBS, 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubando durante 5-15 min à temperatura ambiente, no escuro.

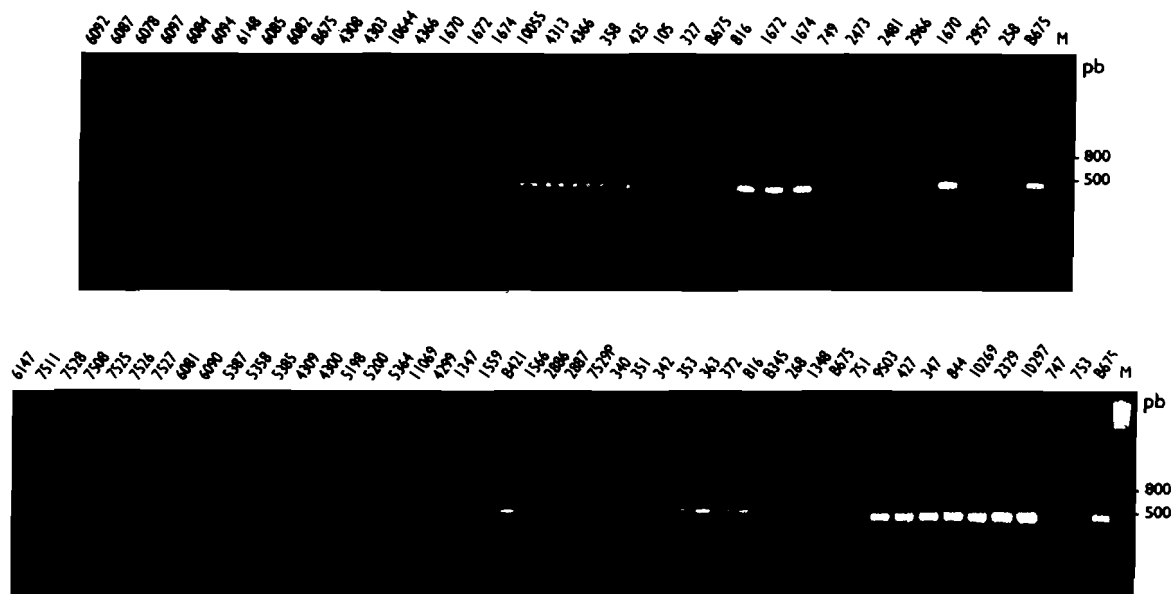
### **3.3- RESULTADOS**

#### **3.3.1- Diferenciação entre estirpes europeias e africanas por PCR**

A possibilidade de se utilizar um único método baseado em PCR para diferenciar estirpes europeias de estirpes africanas foi testada utilizando o par de iniciadores 7500BP1L e 3480BPR (Tabela 3.2). Este par de iniciadores localiza-se nas zonas adjacentes à região de 8,84 kb ausente nas estirpes europeias (Figura 3.1). Nas condições óptimas de amplificação das estirpes europeias era, no entanto, improvável obter-se um produto de amplificação nas estirpes africanas, dada a grande diferença de dimensões dos fragmentos previstos para cada grupo de estirpes. De facto, utilizando as condições normais de amplificação e a polimerase de DNA *Taq*, obteve-se amplificação de um fragmento de 445 pb na estirpe europeia B675, não ocorrendo amplificação na estirpe tipo PG1 e nas estirpes africanas usadas como controlo (Figura 3.5).



**Figura 3.5-** Análise, em electroforese de gel de agarose a 1%, dos produtos de amplificação por PCR com os iniciadores 7500BP1L e 3480BP-R em condições standard, a partir do DNA da estirpe europeia B675 e das estirpes africanas Fatick e Gemu Goffa. O fragmento de 450 pb amplificado apenas na estirpe europeia B675 está assinalado por uma seta.

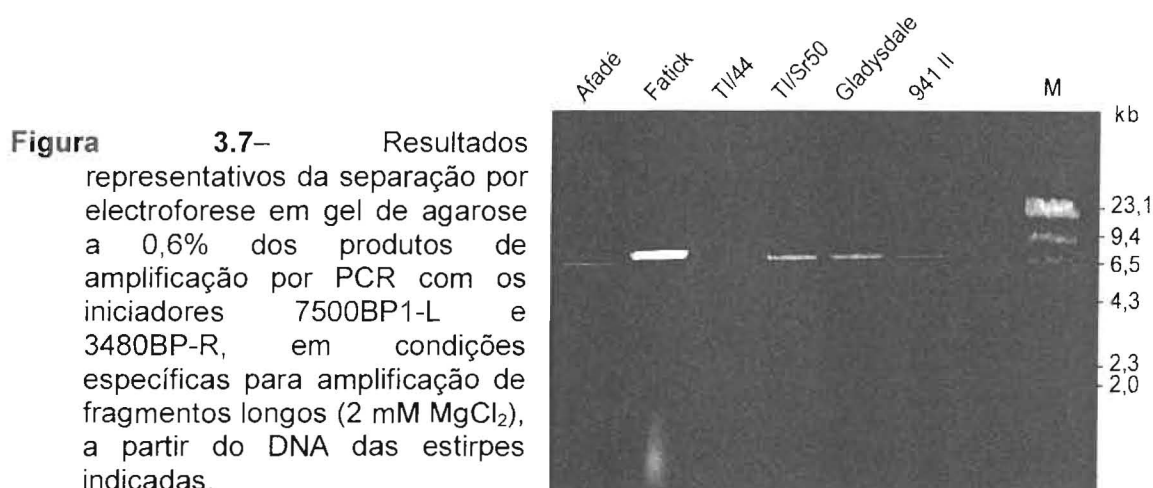


**Figura 3.6-** Avaliação do método de PCR para detecção específica de estirpes europeias de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. As estirpes encontram-se listadas na Tabela 3.1, com excepção das estirpes de *Mycoplasma bovis* 747 e 753 usadas como controlo negativo. Das 84 estirpes europeias analisadas, são apresentadas 78. A estirpe B675 foi utilizada como controlo positivo. M- marcador de pesos moleculares múltiplos de 100 pb (Pharmacia).

Para avaliar se os resultados da reacção de PCR eram específicos das estirpes europeias foram testadas 84 estirpes de campo isoladas em vários países europeus, maioritariamente em Portugal, tendo todas elas apresentado um produto de amplificação de 450 pb (Tabela 3.1 e Fig. 3.6).

As condições de PCR para amplificação de fragmentos longos foram optimizadas usando uma mistura de polimerases de DNA *Taq* e *Pwo* e diferentes concentrações de  $MgCl_2$ , utilizando como DNA-molde 500 ng da

estirpe Afadé. Verificou-se, assim, que a concentração óptima de  $MgCl_2$  na reacção era superior a 1,75 mM. Tendo em conta estes resultados, foi utilizada uma concentração de 2 mM de  $MgCl_2$  na mistura de reacção. Foram analisadas 13 estirpes africanas, uma estirpe australiana e a estirpe tipo PG1, obtendo-se para todas um produto de amplificação com 9,3 kb (Tabela 3.1 e Figura 3.7).



### 3.3.2- Detecção de estirpes africanas

A técnica de PCR para detecção específica de estirpes africanas foi desenvolvida e avaliada utilizando os iniciadores 7500BP9L e 7500BP9R (Figura 3.1) que permitem amplificar duas regiões de repetição directa localizadas à esquerda e à direita do elemento de inserção IS1634. Todas as 13 estirpes africanas, uma australiana e a estirpe tipo PG1 apresentaram amplificação de um fragmento de 300 pb em condições usuais e de um fragmento de 2650 pb (Tabela 3.1) utilizando 1,75 mM  $MgCl_2$ , polimerases de DNA *Taq/Pwo* na mistura de reacção e condições de amplificação com maior tempo de elongação.

### 3.3.3- Expressão e purificação da proteína heteróloga LppB-His

As diferentes amostras recolhidas durante o processo de expressão (Figuras. 3.4 e 3.8) foram analisadas em SDS-PAGE a 12,5 %. Verificou-se que a proteína expressa se encontrava predominantemente associada ao sedimento celular após sonicação (Amostra 5), tendo, por isso, esta amostra sido seleccionada para purificação, em condições desnaturantes com

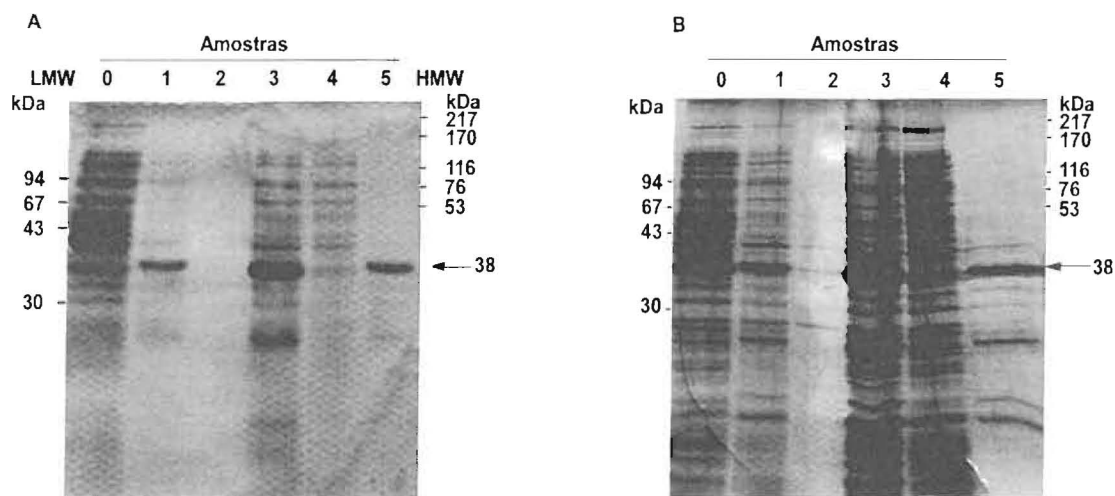
hidroclorato de guanídio, em coluna de níquel Ni-NTA. Várias fracções de 1 ml foram recolhidas no processo de eluição com PNG de pH 7 a 4,5. A análise em SDS-PAGE de algumas dessas fracções revelou que o polipéptido Lpp-His, com a dimensão prevista de 38,2 kDa, era eluído a pH 4,5 (Figura 3.9), tendo-se quantificado a proteína em cada uma das fracções e verificado que a sua concentração variava entre 60 e 202 µg/ml. As fracções mais concentradas foram reunidas e usadas na produção de anticorpos policlonais monospecíficos, por imunização de coelhos.

Estudos paralelos apoiaram a hipótese de se tratar provavelmente de uma proteína de membrana (Vilei *et al.*, 2000). A análise com Triton X-114 permite testar a hidrofobicidade e identificar lipoproteínas (Cheng *et al.*, 1995). Neste método, proteínas de membrana hidrofóbicas são incorporadas nas micelas de Triton X-114, enquanto que as proteínas hidrofílicas são retidas na fase aquosa. A proteína LppB da estirpe Afadé foi identificada entre as proteínas da fase com Triton X-114 por meio de imunomarcagem com anticorpos policlonais monospecíficos anti-Lpp-His (Vilei *et al.*, 2000). O alto grau de hidrofobicidade da proteína levou a concluir tratar-se de um componente de membrana.

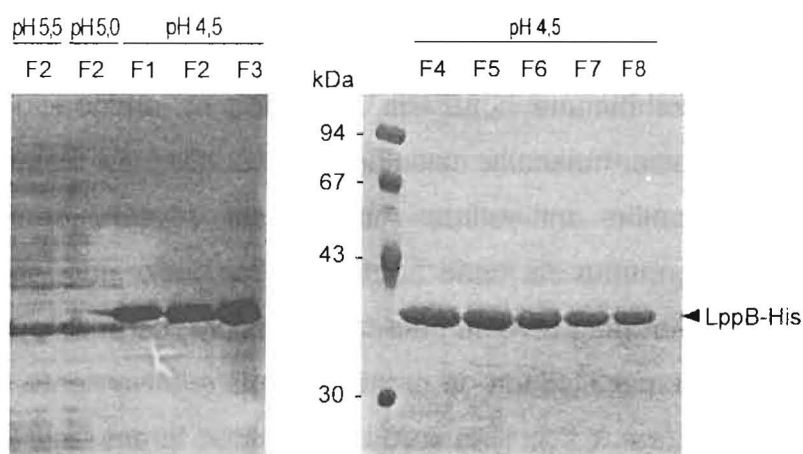
### **3.3.4- Presença da proteína LppB em estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC**

Para estudar a expressão do gene *lppB* em *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e correlacionar essa expressão com o antígeno de 70-71,5 kDa, apenas encontrado em estirpes do grupo africano (Gonçalves *et al.*, 1998), foram analisados antígenos totais de diferentes estirpes africanas e de uma estirpe europeia através de *immunoblotting* usando o anticorpo policlonal monospecífico anti-LppB-His produzido em coelhos. As imunomarcações revelaram uma forte reacção com um antígeno com cerca de 70 kDa, presente apenas nas estirpes do grupo Africano analisadas, incluindo estirpes vacinais (Fig 3.10). Antígenos totais das estirpes europeias 2059, C305, O326, 2022, e 402, das estirpes africanas Afadé, Fatick, B17 e T1/Sr50, das estirpes australianas Gladysdale e V5 e da estirpe tipo PG1 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, foram também imunomarcados com o mesmo soro hiperimune de coelho. Os resultados mostraram que apenas as estirpes africanas e

australianas analisadas e a estirpe tipo PG1 apresentavam um antígeno imunomarcado na zona dos 70 kDa (Vilei *et al.*, 2000).



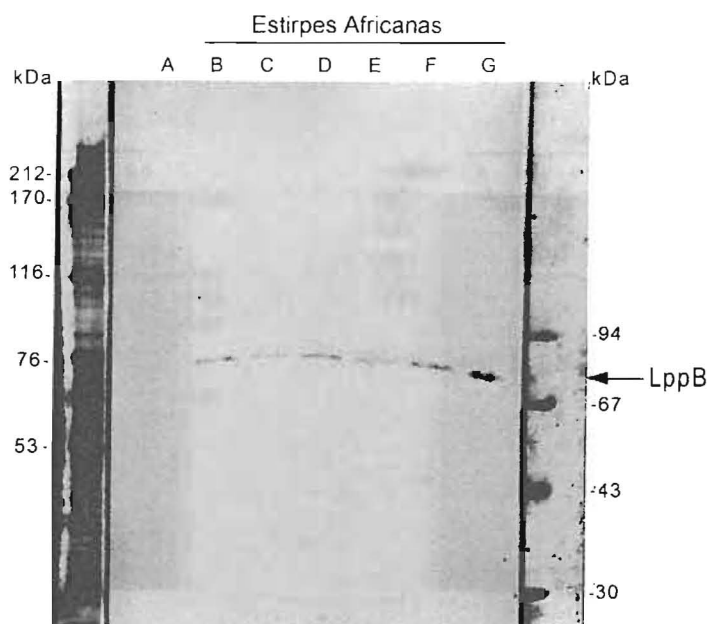
**Figura 3.8-** Análise em SDS-PAGE a 12,5% das amostras recolhidas ao longo do processo de expressão em *E. coli* do péptido recombinante LppB-His, com peso molecular de 38 kDa. **A-** expressão em pequena escala; **B-** expressão em larga escala. A numeração das amostras corresponde à indicada na Figura 3.4: Amostra 0- não induzida; Amostra 1 - induzida; Amostra 2 - sobrenadante da amostra induzida; Amostra 3 - sedimento da amostra induzida; Amostra 4 - sobrenadante da amostra sonicada; Amostra 5 - sedimento da amostra sonicada.



**Figura 3.9-** Análise em SDS-PAGE a 12,5%, de fracções eluídas da coluna de Ni-NTA no processo de purificação do péptido LppB-His. Por cima das fracções numeradas está indicado o pH a que foram eluídas.

O conjunto destes resultados permitiu concluir que a proteína LppB era apenas expressa pelas estirpes do grupo africano mas não pelas estirpes europeias analisadas, suportando a hipótese de que LppB corresponde ao

antigénio de 70-71,5 kDa observado anteriormente nas estirpes do grupo Africano (Gonçalves *et al.*, 1998).



**Figura 3.10-** Expressão da proteína LppB em estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Análise de *immunoblotting* realizada com 10 µg de antígeno total, separado em SDS-PAGE de gradiente 5-15%, da estirpe europeia L2 (A) e das estirpes africanas T1/44 (B), KH3J (C), 9411I (D), 87137-9 (E), 2162 (F) e Filfili (G), transferido para membrana de nitrocelulose e testado com soro monoespecífico policlonal de coelho anti-Lpp-His. Os marcadores de pesos moleculares altos e de pesos moleculares baixos estão indicados, respectivamente, à esquerda e à direita da figura. O antígeno LppB imunomarcado com o soro anti-LppB-His está assinalado pela seta.

### 3.3.5- Especificidade serológica

Quando o polipéptido recombinante LppB-His, contendo os aminoácidos 43-338 da proteína LppB (massa molecular calculada de 38 kDa), foi testado com soro hiperimune de coelho anti-estirpe Afadé, este revelou conter anticorpos dirigidos contra a proteína de fusão LppB-His. Por outro lado, soro hiperimune anti-estirpe B103 europeia revelou não conter anticorpos anti-LppB, confirmando mais uma vez a especificidade da proteína LppB relativamente às estirpes do grupo africano (Figura. 3.11). Três soros de bovinos foram também testados contra o péptido, tendo apenas o soro de infecção experimental de bovino com a estirpe africana Afadé revelado reacção positiva.



**Figura 3.11-** Especificidade de soros hiperimunes de coelho e de soros de bovinos relativamente à proteína de fusão LppB-His. Após purificação de LppB-His colocou-se 2  $\mu$ g em SDS-PAGE a 12,5% e, após transferência para nitrocelulose, imunomarcou-se com: soros hiperimunes de coelho anti-LppB-His (A), anti-estirpe Afadé (B) e anti-estirpe B103 (C); soro de bovino Europeu infectado com PPCB (D); soros de bovinos infectados experimentalmente com estirpe africana Afadé (E) e estirpe europeia L2 (F).

### 3.4—DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos moleculares, utilizando o perfil do elemento de inserção IS1296 revelaram a existência de dois grupos distintos de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC: as isoladas nos últimos 15 anos durante surtos de PPCB ocorridos em diferentes países Europeus e as isoladas em África e na Austrália ao longo dos últimos 50 anos (Cheng *et al.*, 1995). Esta diferença a nível molecular tornou-se mais relevante quando se obtiveram resultados indicando que o grupo de estirpes africanas era potencialmente mais virulento do que o grupo de estirpes europeias (Houshaymi *et al.*, 1997; Abdo *et al.*, 1998).

Na tentativa de identificar diferenças genéticas significativas entre os grupos Europeu e Africano, que pudessem estar correlacionadas com uma



diferença antigénica característica manifestada pela ausência de um antígeno de 70-71,5 kDa nas estirpes europeias (Gonçalves *et al.*, 1998), comparou-se, em duas estirpes representativas de cada um dos grupos, um *locus* de DNA análogo (Vilei *et al.*, 2000). Este estudo revelou que o genoma da estirpe europeia não possuía um segmento de DNA de 8,84 kb. A caracterização de ambas as extremidades do fragmento na estirpe africana revelou a presença de grelhas de leitura aberta que correspondiam a genes completos, enquanto que na estirpe europeia apenas se encontraram fragmentos destas ORF (Figura 3.1), indicando que a diferença genética observada foi muito provavelmente devida a uma deleção que originou o grupo de estirpes europeias, e não a uma inserção nas estirpes africanas. Estes dados sugerem que as estirpes europeias poderão descender de uma estirpe ancestral pertencente ao grupo africano de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

Os dados obtidos forneceram bases importantes para melhor se poder controlar os surtos de PPCB na Europa, desenvolvendo métodos que permitem distinguir rapidamente os dois grupos de estirpes e os bovinos infectados por um ou outro grupo.

Relativamente ao primeiro objectivo proposto para este estudo, o sistema de PCR desenvolvido, utilizando os iniciadores 7500BP1L e 3480BPR baseados nas regiões flangeadoras do fragmento de 8,84 kb ausente nas estirpes europeias, foi avaliado para uso em rotina na identificação de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC de origem europeia. A amplificação de um fragmento de 450 pb é uma confirmação directa e específica de estirpes europeias de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, permitindo não só identificar a espécie e sub-espécie como a origem da estirpe. Nas condições ensaiadas, nenhuma outra estirpe testada apresentou produto de amplificação, incluindo *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (J. Frey, comunicação pessoal).

Apenas as estirpes com resultado negativo nas condições experimentais de rotina deverão ser testadas em condições especiais de elongação e mistura de polimerases de DNA *Taq* / *Pwo*. Já nestas condições, para além das estirpes europeias (produto amplificado com 450 pb) e africanas (produto amplificado com 9,3 kb) outros micoplasmas pertencentes ao grupo "*Mycoplasma mycoides*" apresentam amplificação. Tal é o caso de *M.*

*mycoides* subsp. *mycoides* LC (produto amplificado com 6,9 kb), *M. mycoides* subsp. *capri* (produto amplificado com 7,5 kb) e *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino (produto amplificado com 3,5 kb) (J. Frey, comunicação pessoal).

É importante salientar que com o teste de PCR, usando os iniciadores 7500BP1L e 3480BPR em condições de rotina, a confirmação de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC de origem europeia é mais rápida, fácil de executar e económica do que a análise por *Southern blot* do perfil da sequência de inserção IS1296 (Cheng *et al.*, 1995).

Têm sido desenvolvidos diversos sistemas para detecção de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC baseados na amplificação por PCR de segmentos de DNA de função desconhecida (Bashiruddin *et al.*, 1994; *idem*, 1994a; Dedieu *et al.*, 1994), de sequências do gene de RNA ribossómico 16S (Persson *et al.*, 1999), ou do gene que codifica a proteína imunogénica P72 (Miserez *et al.*, 1997). A sensibilidade, especificidade e rapidez da técnica de PCR foram também avaliadas na identificação de estirpes de campo de micoplasmas bovinos (Botelho *et al.*, 1994) e a sua eficiência no diagnóstico da PPCB comparada com os métodos convencionais de isolamento e identificação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC em diferentes amostras clínicas (Botelho & Regalla, 1996).

Contudo, todos estes sistemas de PCR permitem a identificação indiferenciada de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC independentemente da sua origem. Assim sendo, a existência de um método de PCR específico de um grupo de estirpes é de grande importância num plano de erradicação, não só pelo contributo a nível epidemiológico, permitindo determinar por métodos moleculares a origem de um surto, mas também pelo facto das estirpes apresentarem um grau de virulência maior ou menor consoante a sua origem africana ou europeia.

Um outro sistema de PCR, baseado na região flanqueadora de uma cópia do elemento IS 1296, permitiu a identificação das estirpes vacinais T1 (T1/44 e T1Sr), usando iniciadores complementares a um dos extremos do elemento e à sua região adjacente (Lorenzon *et al.*, 2000). Estas regiões, dada a sua variabilidade intraespecífica, parecem ser indicadas para desenvolver métodos epidemiológicos.

Entre as diferentes grelhas de leitura aberta encontradas no segmento de DNA de 8,84 kb, específico das estirpes africanas, identificou-se o gene *lppB*, ausente nas estirpes europeias, que codifica uma potencial lipoproteína de membrana, localização deduzida por comparação da sua sequência com sequências conhecidas e por análise com Triton X-114 (Vilei *et al.*, 2000). Deste modo, a expressão da proteína LppB nas estirpes africanas parece ser uma característica fenotípica importante que permite distinguir o grupo de estirpes africanas do grupo de estirpes europeias, explicando também a diferença anteriormente observada no perfil antigénico na zona de 70-71,5 kDa entre diferentes estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Gonçalves *et al.*, 1998; Poumarat & Solsona, 1994). Por isso, ao expressar-se em *E. coli* um fragmento desta proteína, o polipéptido recombinante de 38 kDa com extensões de poli-histidinas LppB-His, pretendeu-se desenvolver um teste imunológico diferencial que indicasse a origem da infecção em bovinos seropositivos na prova de fixação do complemento (PFC) com o antígeno *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC estirpe B-103.

O facto de se ter verificado, por análise de *immunoblotting* com o soro monoespecífico anti-LppB-His contra antígenos totais de estirpes do grupo *M. mycoides*, que a proteína LppB é também expressa em *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino (Vilei *et al.*, 2000), não invalida a sua utilidade em testes de *immunoblotting* usando soros de bovinos com reacção positiva à PPCB na prova de fixação do complemento.

A presença do gene *lppB* em estirpes vacinais, como tal avirulentas ou de baixa virulência, de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC africanas e australianas, assim como a expressão da proteína LppB nestas estirpes, indica que ou a sua virulência é atenuada por outro *locus* genético, ou esta proteína não é responsável pela maior virulência manifestada pelas estirpes de campo africana quando comparadas com as estirpes europeias.

Lipoproteínas de membrana de vários micoplasmas patogénicos mostraram induzir blastogénese e secreção de citocinas pró-inflamatórias por um mecanismo distinto do dos lipopolissacáridos, podendo, portanto, ser factores importantes de virulência nos micoplasmas (Brenner *et al.*, 1997;

Herbelin *et al.*, 1994; Mühlradt & Frisch, 1994; Rawadi & Roman-Roman, 1996). Para além disto, as lipoproteínas desempenham um papel importante na estabilidade e integridade da frágil membrana dos micoplasmas (Razin *et al.*, 1998). Assim, a proteína LppB, não sendo só por si um factor de virulência, poderá contribuir indirectamente para uma maior capacidade patogénica das estirpes africanas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

4

---

#### **4. CARACTERIZAÇÃO DE UMA REGIÃO GENÓMICA ASSOCIADA A ELEMENTOS DE INSERÇÃO DA ESTIRPE PORTUGUESA *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC B676P/93**

##### **4.1 – INTRODUÇÃO**

Como foi descrito no Capítulo 2, a estirpe B676P/93 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC apresentou um perfil de restrição e hibridação, com uma sonda baseada na sequência IS1296, diferente do perfil exibido pelas restantes estirpes analisadas. A diferença residiu na existência de uma cópia adicional desta sequência, em comparação com as outras estirpes europeias, localizada num fragmento *Hind*III com cerca de 6,1 kb. Este perfil tinha sido até agora apenas observado numa outra estirpe europeia, isolada em Itália em 1992, também a partir de pulmão de bovino (Cheng *et al.*, 1995).

Ao contrário do que acontece nas estirpes africanas, o aparecimento de um novo perfil da sequência de inserção IS1296 constitui um acontecimento raro nas estirpes europeias, que apresentam um padrão muito homogéneo, indicativo de grande estabilidade genómica.

Tal facto levou à tentativa de elucidar a razão da existência desta inserção adicional e, sobretudo, as consequências daí resultantes. Os dados iniciais pareciam indicar tratar-se de um fenómeno esporádico e sem continuidade. Com efeito, esta inserção adicional, para além de se observar raramente, parecia conduzir a uma incapacidade de propagação *in vivo* das estirpes que a possuíam, as quais se revelavam incapazes de originar novas infecções em bovinos. Havia, portanto, indícios de se tratar de um acontecimento deletério para a capacidade de propagação da infecção por parte do micoplasma. As variações na organização genómica apresentadas por algumas estirpes de micoplasmas são de grande relevância no estudo da sua patogenicidade, visto que determinam características fenotípicas e antigénicas que condicionam o desenrolar das interações entre o micoplasma e o hospedeiro.

A descoberta de segmentos de DNA que se podem mover no genoma, duplicando-se por vezes a si próprios ou ao DNA-alvo durante o processo, levantou naturalmente a questão sobre como a evolução do genoma tem sido

afectada por este fenómeno. As respostas a questões sobre o papel das sequências de inserção e a sua influência no genoma do hospedeiro são ainda pouco claras. Está por esclarecer totalmente se estes elementos genéticos com capacidade de transposição têm um efeito neutro ou negativo nos seus hospedeiros (hipótese do DNA parasita) ou se, pelo contrário, constituem uma mais valia, tendo um papel positivo na adaptação do organismo a novas condições ambientais. Sabe-se que alguns IS (famílias IS1 e IS5) de estirpes de *E. coli* não são quantitativamente auto-reguláveis, conduzindo, com o aumento do seu número, a uma fragilidade do hospedeiro. Outros IS (família IS3) afectam pouco a estabilidade do genoma hospedeiro, visto o seu número ser altamente regulado. Outros ainda (famílias IS2, IS4 e IS30), apesar do seu número de cópias parecer não estar limitado, afectam pouco a estabilidade do genoma do hospedeiro (Hartl & Sawyer, 1988 e Sawyer *et al.*, 1987; citados por Galas & Chandler, 1989). Alguns IS, como os IS10 e IS50, são favoráveis às estirpes hospedeiras que os possuem devido, respectivamente, à indução de mutações favoráveis ou a um aumento da taxa de crescimento resultante de proteínas codificadas pelo IS.

Existem, assim, efeitos benéficos e/ou prejudiciais induzidos pelos IS, mas muitos outros, com um papel eventualmente importante na evolução selectiva, estão ainda por descobrir.

Uma das propriedades mais importantes dos IS é, sem dúvida, a diversidade de efeitos que têm na expressão genética. A especificidade de alguns IS relativamente à sequência-alvo de inserção poderá constituir informação relevante. Determinados IS, por exemplo, têm tendência para se inserirem em promotores ou próximo deles. A especificidade e frequência de inserção de um mesmo IS, ou de mais do que uma família de IS num mesmo genoma, dará indicações sobre a probabilidade de formação de um transposão composto. A actividade do IS é afectada por vários factores, incluindo as sequências flanqueadoras, assim como a actividade destas também é influenciada pelo IS.

Partindo do que já é conhecido relativamente a sequências de inserção de outros microrganismos, como *E. coli*, e das muitas questões levantadas a esse propósito, e tendo em conta que este problema só pode ser abordado

examinando situações específicas, tomou-se como modelo a estirpe B676P/93 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC isolada em Portugal para tentar elucidar alguns aspectos do papel dos IS e das suas sequências flanqueadoras.

\* \* \*

Com o objectivo de conhecer as sequências flanqueadoras da cópia adicional do elemento de inserção IS1296 existente no genoma da estirpe B676P/93, estabeleceu-se a seguinte estratégia experimental:

- i) Clonagem de fragmentos resultantes da digestão do genoma da estirpe B676P/93 com a endonuclease HindIII;
- ii) Selecção dos clones que hibridem com uma sonda derivada da sequência de inserção IS1296;
- iii) Análise por sequenciação do clone que contenha um fragmento de DNA inserido de cerca de 6,1 kb que hibride com o elemento de inserção IS1296;
- iv) Caracterização *in silico* da sequência obtida, dando particular atenção à presença de elementos reguladores e de presumíveis genes.

## **4.2- MATERIAIS E MÉTODOS**

Os métodos convencionais de biologia molecular foram executados de acordo com protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1990).

### **4.2.1- Estirpes bacterianas**

A estirpe *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC B676P/93, isolada de pulmão de bovino de uma exploração da região de Entre Douro e Minho, serviu de base à construção da biblioteca genómica. Os fragmentos de DNA genómico, hidrolisado com *HindIII*, foram clonados na estirpe *E. coli* XI1 Blue MRF'



(Stratagene), genótipo: *supE44 hsdR17 recA1 endA1endA46 thi relA1 lac-F' [pro AB+ lac<sup>d</sup> lacZΔM15Tn10(tet<sup>r</sup>)]*.

#### 4.2.2 – Construção da biblioteca genómica

Foi construída uma biblioteca genómica da estirpe B676P/93 por inserção de fragmentos do genoma, hidrolisado com a endonuclease *Hind*III, no local de reconhecimento desta endonuclease no *Multiple Cloning Site* (MCS) do plasmídeo pBluescript II SK(-) (Stratagene).

Os fragmentos *Hind*III, obtidos por hidrólise de 0,5 µg do genoma da estirpe B676P/93 de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, foram clonados em pBS SK(-) na sequência-alvo desta enzima. Para a ligação dos extremos coesivos dos fragmentos ao plasmídeo, linearizado com *Hind*III e desfosforilado, utilizou-se 1 U de ligase de DNA do bacteriófago T4 (Stratagene), na presença de 1 mM ATP e tampão de ligação (Stratagene). A reacção, num volume de 15 µl, foi efectuada a 14° C durante a noite.

Os plasmídeos recombinantes em pBS SK(-) foram propagados e mantidos na estirpe bacteriana *E. coli* XL1-Blue MRF'.

##### *Preparação de células competentes de E. coli*

A membrana celular das células de *E. coli* XL1-Blue MRF' foi tornada permeável por tratamento com iões divalentes (Ca<sup>2+</sup>), segundo o método descrito por Cohen e Chang (1972). Uma colónia isolada foi inoculada em 50 ml de meio de cultura LB e incubada a 37°C, com agitação, durante 18 h. A cultura foi diluída 1/100 em 400 ml de meio LB e incubada a 37°C, com agitação (250 rpm), até atingir DO<sub>600</sub>= 0,375, correspondente à fase exponencial de crescimento.

Depois de distribuída por aliquotas de 50 ml, a cultura foi colocada no gelo 5 a 10 min e centrifugada 7 min a 1600 g, 4°C. As células sedimentadas foram ressuspensas em 10 ml de solução de CaCl<sub>2</sub> fria (60 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% v/v glicerol, 10 mM PIPES, pH 7,0) e a suspensão centrifugada 5 min a 1100 g, 4°C. Repetiu-se a operação, ressuspensando o sedimento de células em 10 ml da mesma solução de CaCl<sub>2</sub> fria. Colocou-se no gelo 30 min e centrifugou-se como anteriormente. Ressuspendeu-se as células em 2 ml de solução fria de

CaCl<sub>2</sub> e distribuiu-se em alíquotas de 200 µl, as quais foram conservadas a –70°C até serem utilizadas.

#### *Transformação de células competentes*

As células de *E. coli* XL1Blue MRF', tornadas competentes pelo tratamento com CaCl<sub>2</sub> atrás descrito, foram transformadas com 5 a 10 µl (10 µg) de mistura de ligação. Alíquotas de 200 µl de células competentes foram retiradas directamente da temperatura de –70°C para gelo, e mantidas em gelo durante 30 a 60 min após adição da mistura de ligação. Findo este período, foi dado um choque térmico de 42°C durante 2 min. As células foram colocadas em gelo durante mais 2 min e incubadas a 37°C em 900 µl de meio de cultura LB durante 1 h, com agitação vigorosa. Após centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 200 µl de meio LB e espalhado em placas de meio LB/agar suplementado com 50 µg/ml de ampicilina, contendo ainda cada placa de Petri 40 µl de X-Gal (20 mg/ml em dimetilformamida) e 25 µl de IPTG (100 mM).

#### *Seleção de transformantes*

A selecção de colónias de células transformadas com o vector recombinante foi feita com base na cor branca, em meio de cultura LB contendo 1,5% de Bactoagar e suplementado com ampicilina (50 µg/ml), X-Gal (20 mg/ml) e IPTG (100 mM), ou com base nos resultados da hibridação *in situ*, de réplicas em filtro, com sonda específica marcada com digoxigenina (Boehringer Mannheim).

As colónias seleccionadas foram transferidas para meio líquido LB suplementado com ampicilina e conservadas a –70°C no mesmo meio de cultura com 15% v/v de glicerol.

### **4.2.3- Preparação de DNA genómico de micoplasmas**

Esta preparação foi feita de acordo com o descrito no Capítulo 2 (2.2.2).

### **4.2.4- Extracção de DNA plasmídico para sequenciação**

Para a produção em média escala de DNA plasmídico recombinante, adoptou-se o método da lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979), com os sistemas

*Qiagen Plasmid Midi Kit* e *Qiafilter* (QIAGEN), este último para purificação por cromatografia. O DNA plasmídico foi extraído a partir de 25 a 50 ml de cultura em meio LB. As células foram sedimentadas a 4°C por centrifugação a 6000 *g* durante 15 min e ressuspensas em 4 ml de 50 mM Tris.HCl, pH 8,0 e RNase A 100 µg/ml. A lise das células foi efectuada por adição de 4 ml duma solução 200 mM de NaOH e 1% p/v SDS, inversão suave e incubação à temperatura ambiente durante 5 min. O DNA genómico de *E. coli* foi precipitado com 3,0 M acetato de potássio, pH 5,5, e o lisado incubado durante 10 min antes de filtrado no *Qiafilter Cartridge*. O DNA plasmídico foi purificado em colunas Qiagen-tip 100, segundo as indicações do fabricante, precipitado com 0,7 volumes de isopropanol e recuperado por centrifugação a 12 000 *g* durante 30 min a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol a 70% v/v e ressuspensado em 100 µl de água bidestilada ou tampão TE. A concentração de DNA foi determinada por leitura da absorvência a 260 nm, considerando que uma unidade de A<sub>260</sub> corresponde a 50 µg/ml de DNA em cadeia dupla.

#### **4.2.5- Digestão de DNA com enzimas de restrição**

As hidrólises simples de DNA com enzimas de restrição foram efectuadas de acordo com as recomendações do fabricante New England Biolabs. As hidrólises múltiplas foram efectuadas em simultâneo, em caso de compatibilidade de tampões e temperaturas, ou em etapas sucessivas em caso contrário. A hidrólise de DNA plasmídico (2 µg em 10 µl) foi realizada com 5-10 unidades de *Hind*III durante 1 h. A desfosforilação do plasmídeo nos extremos 5' foi feita imediatamente após digestão, adicionando 2 µl de CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) - 1 U/µl e incubando 45 min a 37°C. Seguidamente, as enzimas foram inactivadas por aquecimento a 75°C durante 10 min. Procedeu-se à purificação do DNA por extracção com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Ausubel *et al.*, 1990) e ressuspendeu-se em 10 µl de tampão TE. A concentração aproximada de plasmídeo linearizado e desfosforilado foi de 100 ng/µl.

Quando se pretendeu analisar o resultado das reacções, por electroforese em gel de agarose, adicionou-se 0,2 volumes de tampão da amostra contendo

30% v/v glicerol, 10 mM EDTA, 0,25% p/v azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol.

Os produtos da digestão foram analisados por electroforese em gel horizontal de agarose (Tipo V- Sigma, MP – Boehringer Mannheim ou SeaPlaque GTG - FMC) a 0,7, 1,0 ou 1,5%, conforme a dimensão dos fragmentos esperados, em tampão TBE 1x . Para visualização posterior do DNA, incorporou-se no gel 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BrEt). As electroforeses foram feitas à temperatura ambiente, em tampão TBE 1x. Os fragmentos nos géis foram visualizados em transiluminador de radiação ultravioleta com comprimento de onda de 300 nm.

#### 4.2.6 – Clonagem e subclonagem

##### *Clonagem de fragmentos de restrição purificados a partir de gel de agarose*

Os fragmentos com dimensão entre 4,4 e 6,6 kb, resultantes da hidrólise de 5 µg de DNA da estirpe B676P/93 com *Hind*III (10 U/µg de DNA), foram excisados de gel de agarose SeaPlaque a 0,7 % em tampão TAE e purificados com o sistema *Qiaquick Gel Extraction kit* (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Seguidamente, foram clonados, tal como descrito em 4.2.2, em pBS SK(-) previamente linearizado com *Hind*III e desfosforilado.

##### *Subclonagem direccionada por execução de deleções (método de Henikoff, 1984)*

Este método baseia-se na afinidade da exonuclease III (3'-exonuclease) para DNA de cadeia dupla e na sua capacidade de digerir, a partir de um extremo, uma cadeia de DNA que apresente um extremo coesivo 3' retraído ou um extremo 3' rômbo (*blunt-end*). Os outros extremos, coesivos e com extremo 3' protuberante, encontram-se protegidos da digestão enzimática, sendo portanto as deleções unidireccionais. Uma das aplicações desta estratégia é a sequenciação de grandes fragmentos de DNA clonados em vector, construindo-se uma biblioteca de deleções, formada por subclones cada vez com menor dimensão resultantes de deleções sucessivas da sequência inserida.

As deleções foram feitas no plasmídeo recombinante previamente seleccionado, utilizando o sistema *Double-Stranded Nested Deletion*

(Pharmacia) de acordo com o protocolo do fabricante para sequenciação de fragmentos de DNA clonados. O plasmídeo pBSIS114 foi linearizado com o par de endonucleases de restrição *SacI* e *SmaI* com alvos próximos, localizados apenas no MCS do plasmídeo pBS SK(-). A enzima *SacI* gerou um extremo resistente à exonuclease III (Exo III), próximo do promotor T3 do plasmídeo, enquanto que *SmaI* gerou um extremo 3' retraído susceptível, adjacente à sequência de DNA inserida e que se pretendia delectar. A incubação do DNA plasmídico recombinante com a enzima Exo III ao longo do tempo resultou na remoção progressiva de nucleótidos, gerando uma cadeia simples de DNA posteriormente removida por tratamento com nuclease S1. A intervalos de tempo de 3 ou 6 min foram recolhidas aliquotas, que foram analisadas por electroforese em gel de agarose a fim de avaliar a extensão das delecções.

Diferentes construções foram seleccionadas e recircularizadas com ligase de DNA do bacteriófago T4 e usadas para transformar células de *E. coli* XL1Blue MRF' competentes. O DNA plasmídico foi extraído dos vários clones obtidos usando o *Qiaprep Spin miniprep plasmid kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA plasmídico do banco de transformantes delectados foi analisado por electroforese dos produtos de hidrólise com a endonuclease *BssHII*, cujos alvos flanqueiam o MCS. Foram seleccionados clones correspondentes a inserções com dimensões adequadas, entre 4,4 e 6,6 kb, de modo a possibilitar a sequenciação integral do fragmento inserido no vector. Na Figura 4.1 exemplifica-se esta etapa de selecção.



**Figura 4.1-** Análise electroforética de clones do banco de transformantes delectados, obtidos a partir do recombinante pBS114 por hidrólise com *BssHII* dos respectivos DNAs.

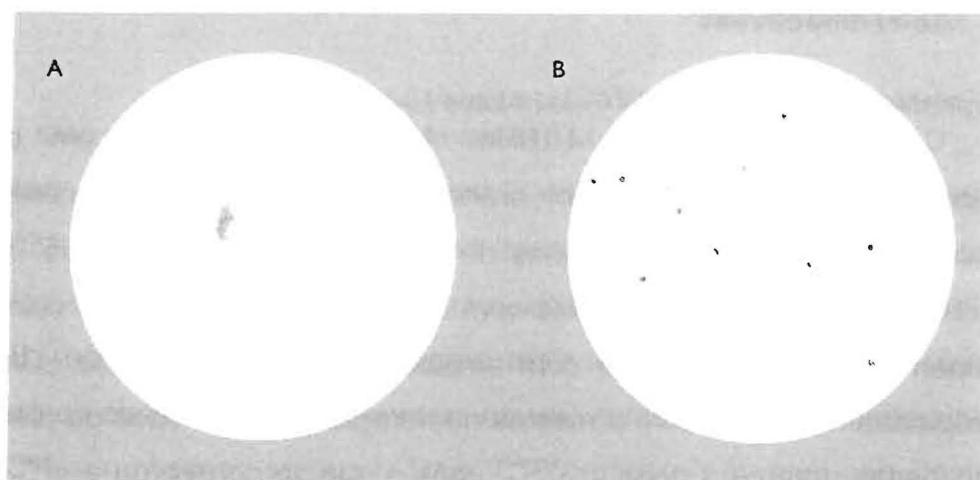
#### 4.2.7 – Imobilização de DNA e hibridação em suporte sólido com sondas não-radioactivas

##### *Transferência in situ de DNA de células bacterianas*

Colónias de *E. coli* XL1Blue MRF' transformadas com plasmídeo recombinante (colónias de cor branca) foram repicadas em paralelo, com palitos estéreis, para membranas de nitrocelulose (Protran BA85 0,45  $\mu\text{m}$  – Schleicher & Schuell) marcadas com quadriculado numerado e colocadas na superfície de meio LB/agar com ampicilina, e para placas de LB/agar com ampicilina marcadas com a mesma numeração. Os dois tipos de placas foram incubadas durante a noite a 37°C, após o que se conservou a 4°C apenas a placa com as colónias directamente crescidas em meio de cultura. As colónias crescidas sobre a membrana foram lisadas e o DNA desnaturado e fixado para posterior hibridação.

As membranas foram colocadas sobre papel 3MM embebido em 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH (solução desnaturante), durante 5 min, e transferidas para papel embebido em 1M Tris.HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl (solução neutralizante) durante o mesmo período de tempo. Foram seguidamente lavadas 5 min em 0,2 M Tris.HCl pH 7,5, 2x SSC, transferidas para 2x SSC e, imediata e rapidamente, secas em papel 3 MM. O DNA foi então fixado à membrana por secagem a 80°C, em estufa com vácuo, durante 90 min.

Outro processo utilizado para a selecção de recombinantes do banco genómico da estirpe B676P/93 consistiu na transferência (*peeling*), de todas as colónias recombinantes bem separadas em placa de LB/agar, para filtro de nitrocelulose. Colocou-se durante 5 min um filtro Protran BA85 sobre as colónias, tendo o cuidado de marcar o filtro com uma agulha hipodérmica para saber a orientação correcta, retirou-se da placa e procedeu-se como descrito no parágrafo anterior para lise das células e fixação do DNA. A placa de LB/agar foi incubada mais 5 a 6 h a 37°C e depois guardada a 4°C até hibridação dos filtros e revelação do sinal. Na Figura 4.2 pode ver-se o resultado dos dois processos de hibridação *in situ* de colónias.



**Figura 4.2-** Resultado da hibridação de colônias de transformantes, transferidas para membrana de nitrocelulose, com sonda COLH35 marcada com digoxigenina e preparada a partir da sequência IS1296. As manchas e pontos mais escuros correspondem a hibridações positivas. **A-** membrana da transferência das colônias de cor branca, repicadas individualmente; **B-** membrana da transferência de todas as colônias da placa por *peeling*.

#### *Transferência de DNA de gel de agarose para membrana de nylon - Southern blotting*

Após separação electroforética em gel de agarose, os fragmentos de DNA foram transferidos para suporte sólido com base no método descrito por Southern *et al.* (1975). Os fragmentos de DNA resultantes de digestão enzimática foram previamente despurinados, para facilitar a sua transferência, colocando o gel em 0,25 N HCl durante 10-15 min, seguindo-se duas lavagens em água bidestilada. A transferência foi efectuada no aparelho *Vacuum Blotter Model 785* (Biorad), montado de acordo com as instruções do fabricante, usando como solução de transferência 0,5M NaOH, 0,6 M NaCl, durante 2 h sob vácuo (5 polegadas de Hg). Esta solução desnatura as cadeias de DNA e a aplicação de vácuo força o arrastamento dos fragmentos de DNA do gel para a membrana colocada por baixo (*Nylon membranes positively charged* – Boehringer Mannheim). A posição relativa dos fragmentos no gel é, assim, reproduzida na membrana. Terminada a transferência, o filtro foi lavado duas vezes com 2x SSC (10X SSC: 1,5 M NaCl, 0,15 M citrato de sódio, pH 7,7) e os fragmentos de DNA imobilizados e desnaturados por aquecimento a 80°C, em estufa com vácuo, durante 20-30 min (Ausubel *et al.*, 1990).

#### *Preparação de sondas de DNA marcadas com digoxigenina*

As sondas para hibridação foram preparadas em reacções de PCR usando como DNA-molde o DNA genómico da estirpe B676P/93 e os iniciadores IS1296P1-L (5'-AAGCGTTTAGAATAGAAGGGCTA-3') e IS1296P1-R (5'-CTGAATTGTACAGGAGACAATCC-3'), baseados na sequência de IS1296 (Frey, *et al.*, 1995). Devido à grande dimensão do fragmento a amplificar, usou-se uma mistura das duas polimerases de DNA *Taq* e *Pwo* (*Expand Long Template PCR System* - Roche Diagnostica) que possui maior processividade. O DNA genómico (100 ng) foi adicionado a 50 µl de mistura de reacção: 350 µM de cada dNTP, 300 nM de cada iniciador, 1x tampão de reacção com 1,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,75 µl de mistura enzimática e 20 µM de digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim). A reacção de marcação foi efectuada num termociclador MJ Research nas seguintes condições: 2 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturação a 92°C durante 30 s, hibridação a 50°C durante 30 s, elongação a 68°C durante 2 min e um passo final de elongação a 68°C durante 7 min. O produto de amplificação constituiu a sonda IS1296P1L-R, com uma dimensão de 1,25 kb.

Outra sonda foi preparada, pelo mesmo processo, para hibridação com o DNA das colónias fixado em membrana. Neste caso, usou-se como DNA-molde 100 pg do plasmídeo pJFFsc1a5 contendo um fragmento com 828 pb resultante da hidrólise com *EcoRI* da sequência de inserção IS1296 (Frey *et al.*, 1995), 1 U de polimerase de DNA *Taq* (Pharmacia), 2 mM MgCl<sub>2</sub> no tampão de reacção, 50 µM de cada um dos iniciadores COLH5 (5'-CCACACCTTGTTGACAAAAG-3') e COLH3 (5'-CACCATAATAAATTTCTTGC-3') (Figura 3.1) e 50 µM de digoxigenina-11-dUTP. Foram realizados 35 ciclos de amplificação, consistindo cada ciclo de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C e 1 min a 72°C. O produto de amplificação constituiu a sonda COLH35 com uma dimensão de 771 pb.

#### *Hibridação com as sondas marcadas*

A hibridação com sondas marcadas com digoxigenina foi utilizada para selecção de colónias recombinantes (hibridação de colónias), de DNA plasmídico recombinante (ver ponto 4.2.8) ou de DNA plasmídico recombinante digerido com endonuclease de restrição *Southern blot*.



As pré-hibridações foram realizadas em volumes de 20 ml por 100 cm<sup>2</sup> de membrana e as hibridações em volumes de 3,5 ml por 100 cm<sup>2</sup> de membrana, acrescidos de 2 ml por cada membrana extra, em incubadora de hibridação rotativa Biometra OV3 a 68°C. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente, em volumes de 50 ml.

As membranas, humedecidas em 5X SSC, foram pré-hibridadas durante 2 a 3 h a 68° C em tampão de hibridação: 5X SSC, 0,02% p/v SDS, 0,1% p/v N-lauroil-sarcosina e 1% p/v de reagente de bloqueio (BR- *Blocking Reagent*, Boehringer Mannheim). A hibridação decorreu à mesma temperatura, durante 16 a 20 h a 68°C, em tampão de hibridação contendo 5 a 25 ng/ml (3 a 5 µl) de sonda marcada com digoxigenina, preparada como descrito no ponto anterior e desnaturada 15 min a 100° C. As membranas foram então lavadas à temperatura ambiente, duas vezes durante 5 min com 2X SSC contendo 0,1% p/v de SDS e duas vezes durante 15 min com 0,2X SSC contendo 0,1% SDS. Colocou-se, seguidamente, as membranas 1 min em tampão contendo 100 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl pH 7,5 e incubou-se à temperatura ambiente 30 min no mesmo tampão contendo 1% de BR. A hibridação com a sonda foi detectada (*DIG Nucleic Acid Detection Kit* – Boehringer Mannheim) usando anticorpos anti-DIG (anti-digoxigenina-AP, *Fab fragments* - Boehringer Mannheim) marcados com fosfatase e diluídos 1:5000 no mesmo tampão com BR, e incubando mais 30 min à temperatura ambiente, de acordo com o protocolo do fabricante. Após duas lavagens de 15 min cada, com o mesmo tampão sem BR, as membranas foram lavadas 2 min à temperatura ambiente com 100 mM Tris.HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5. A solução de revelação foi preparada com 20 ml deste tampão a que se adicionou 90 µl de NBT (*Nitroblue Tetrazolium Salt* - 75 mg/ml em dimetilformamida) e 70 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato - 50 mg/ml em dimetilformamida). Após aparecimento do sinal de hibridação parou-se a reacção lavando as membranas com água.

#### 4.2.8- Selecção de recombinantes plasmídicos

A selecção de clones, a partir do banco genómico da estirpe B676P/93, com um fragmento inserido contendo a sequência IS1296 foi feita por vários processos e usando diferentes sondas marcadas com digoxigenina. Um dos processos consistiu na transferência *in situ* de DNA de colónias bacterianas transformadas ou de todas as colónias para membrana, como atrás descrito (4.2.7), e subsequente hibridação.

Para confirmação das hibridações, as colónias positivas foram cultivadas em meio líquido LB com ampicilina e o DNA plasmídico extraído com *Qiaprep Spin miniprep plasmid kit* (QIAGEN). Este DNA foi depois aplicado em membrana de *nylon* carregada positivamente (Boehringer Mannheim), usando o sistema de vácuo Minifold I SRC 96D *Dot Blotter* (Schleicher & Schuell) de acordo com as instruções do fabricante. Para simplificar o processo, também foram utilizadas as culturas de colónias de recombinantes directamente do meio líquido, sem extracção prévia de DNA. O processo de pré-hibridação, hibridação e lavagem foi idêntico ao descrito anteriormente para a hibridação de colónias.

Os DNAs dos plasmídeos recombinantes que deram resultado positivo na hibridação *dot-blot* foram reavaliados por PCR efectuado directamente a partir de colónias ou de DNA previamente purificado, para determinar a dimensão do fragmento inserido, usando os iniciadores T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') e T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') que hibridam com as sequências dos promotores T<sub>3</sub> e T<sub>7</sub> do vector. O PCR foi efectuado, como anteriormente descrito para amplificação de fragmentos longos, usando o *Expand Long PCR System* (Roche Diagnostics) e mistura das polimerases *Taq/Pwo*. Para a reacção de PCR directamente a partir de colónias, repicou-se uma colónia positiva para 500 µl de meio líquido e incubou-se 4 h a 37°C com agitação. Centrifugou-se a cultura 15 min a 13200 rpm em centrífuga Eppendorf 5415 D, ressuspendeu-se o sedimento em 50 µl de tampão de lise (0,5% p/v SDS, 0,05 M Tris.HCl pH 8,0, 1 mM DTT),

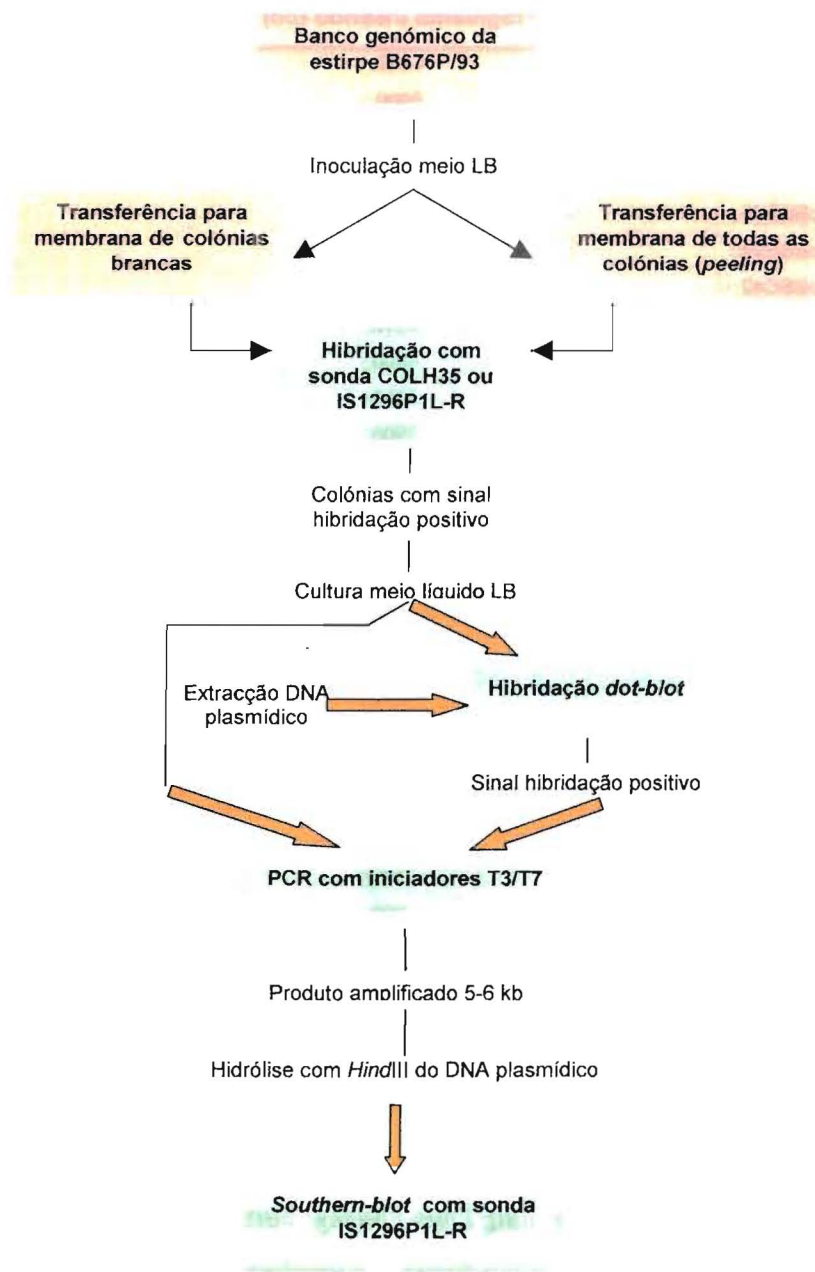
colocou-se a 67°C durante 60 min e, seguidamente, a 95°C durante 15 min. Utilizou-se 10 µl desta suspensão na reacção de PCR.

Os DNAs plasmídicos recombinantes que apresentaram um produto amplificado entre 5 e 6 kb foram hidrolisados com a endonuclease *Hind*III e os fragmentos obtidos transferidos para membrana de *nylon* carregada positivamente (*Southern blot*) e hibridados com sonda, preparada a partir da sequência IS1296 e marcada com digoxigenina, como descrito anteriormente. Este processo encontra-se esquematizado na Figura 4.3.

#### 4.2.9 – Sequenciação de DNA

O fragmento clonado, do clone que originou uma hibridação positiva com a sonda marcada, foi sequenciado pelo método enzimático descrito por Sanger *et al.* (1977), que se baseia na terminação específica da síntese do DNA por incorporação de 2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTPs). Como ponto de partida, utilizou-se DNA plasmídico purificado em coluna QIAGEN como descrito anteriormente.

A sequenciação foi feita em aparelho de leitura automática ALFexpress II DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando o sistema de marcação *Thermo Sequenase Cy 5 Dye Terminator Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com as instruções do fabricante. Partindo-se do princípio de que o plasmídeo recombinante continha inserido o fragmento de cerca de 6,1 kb com a sequência IS1296, foram utilizados nas reacções de sequenciação os iniciadores oligonucleotídicos IS1296S1 (5'-CAACTGAAATATCATATTTATTTGC-3') e IS1296S2 (5'-GGATTGTCTCCTGTACAATTTCAG-3') que hibridam nas regiões terminais do IS1296 (Vilei *et al.*, 1999), permitindo a síntese das sequências adjacentes.



**Figura 4.3-** Representação esquemática do processo de selecção de clones com um fragmento inserido com uma dimensão entre 5 a 6 kb e contendo o elemento IS1296. A zona sombreada a verde indica a metodologia usada na selecção e as setas amarelas o fluxo principal da estratégia experimental.

**Tabela 4.1-** Plasmídeos obtidos por deleção com Exo III do plasmídeo pBSIS114 e utilizados para sequenciação do fragmento clonado da estirpe B676P/93

Plasmídeo	Fragmento inserido (pb)	Concentração (µg/ml)
pBSIS114	6100	450
pBST6	6000	450
pBSB36	5900	250
pBSA6	5700	450
pBSB42	5600	375
pBSE18	5500	525
pBSC42	5400	650
pBSA45	5100	600
pBSQ12	4500	375
pBSC18	4200	375
pBSA15	3900	475
pBSC12	3600	575
pBSD15	3500	600
pBSI24	3500	350
pBSA27	3200	550
pBSA30	2900	500
pBSC30	2200	325
pBSH12	2200	350
pBSK24	2000	425
pBSS12	1800	550
pBSA21	1400	500
pBSA18	1300	525
pBSA24	1200	525
pBSC39	300	475
pBSA12	250	475

Em alternativa, o fragmento clonado foi sequenciado no Institute for Veterinary Bacteriology, Universidade de Berna, Suíça, utilizando o DNA Sequenator AB3100 com o *Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) e iniciadores complementares à sequência dos promotores T<sub>3</sub> e T<sub>7</sub> do vector. Para este tipo de sequenciação foram utilizados 24 DNAs plasmídicos de clones de pBS SK(-) (Tabela 4.1), obtidos por deleção com Exo III, como descrito em 4.2.6, do plasmídeo recombinante que continha o fragmento completo de 6,1 kb. O DNA plasmídico foi neste caso extraído como referido em 4.2.4. As sequências de DNA dos 24 insertos foram ordenadas utilizando o programa Sequencher 3.0 (GeneCodes).

#### 4.2.10 – Análise *in silico*

Para análise das sequências de resíduos nucleotídicos e aminoácídicos, recorreu-se aos vários programas dos pacotes GCG Wisconsin Package, EMBOSS e STADEN e às bases de dados disponíveis no nó Português da rede EMBnet (Pen) localizada no Instituto Gulbenkian de Ciência.

**Tabela 4.2-** Programas utilizados na análise *in silico* das sequências de nucleótidos obtidas e das sequências aminoácídicas inferidas

Programa	Função	Pacote
ANTIGENIC	Detecção de locais antigénicos numa proteína	EMBOSS
BESTFIT	Alinhamento óptimo de duas sequências	GCG
BLAST no NCBI	Comparação com sequências em bases de dados	
CLUSTALW	Alinhamento de sequências	GCG
EXTRACTPEPTIDE	Dedução dos polipéptidos potencialmente codificados	GCG
FASTA	Comparação com sequências em bases de dados	GCG
FINDPATTERNS	Procura de motivos definidos	GCG
FRAMES	Identificação de ORFs	GCG
FTP Explorer	Armazenamento e actualização de ficheiros	
GEECEE	Conteúdo G+C	EMBOSS
GENEDOC	Percentagem de identidade e similaridade	GCG
GOSTVIEW	Apresentação de resultados	
MAP	Mapas de restrição; tradução	GCG
ORF Finder no NCBI	Identificação de ORFs	
PALINDROME	Detecção de repetições invertidas	EMBOSS
PEPSTATS	Composição aminoácídica e massas moleculares	EMBOSS
PEPWINDOW	Perfis de hidropatia de uma proteína	EMBOSS
PILEUP	Alinhamento de sequências	GCG
PUBLISH	Apresentação de resultados	GCG
REPEAT	Detecção de repetições directas	GCG
SEQED	Editor de sequências	GCG
SIGCLEAVE	Locais Potenciais para peptidases de sinal	EMBOSS
TMAP	Previsão de domínios transmembranares (DTM) de uma proteína	EMBOSS

As sequências de DNA e as sequências de aminoácidos inferidas foram comparadas consultando as bases de dados do EMBL/GenBank e utilizando os programas BLASTN, BLASTX e BLASTP (Altschul *et al.*, 1990). Na Tabela 4.2 estão listados os programas mais utilizados. O acesso às bases de dados foi efectuado pelos pacotes mencionados ou através do sistema SRS (*Sequence Retrieval System*).

### **4.3 – RESULTADOS**

#### **4.3.1 - Biblioteca genómica da estirpe B676P/93**

A excisão de gel de agarose de fragmentos com dimensões entre 4,4 e 6,6 kb resultantes da digestão com a endonuclease *Hind*III do genoma da estirpe B676P/93, seguida de clonagem no vector pBS SK(-) linearizado com *Hind*III, resultou num número reduzido de clones totais recombinantes, os quais apresentaram todos fragmentos clonados com dimensão inferior à pretendida. Por isso, esta metodologia foi posta de parte e, em alternativa, construiu-se um banco de clones plasmídicos contendo fragmentos *Hind*III da estirpe B676P/93 inseridos no local *Hind*III do plasmídeo linearizado pBS SK (-), tal como descrito no ponto 4.2.2.

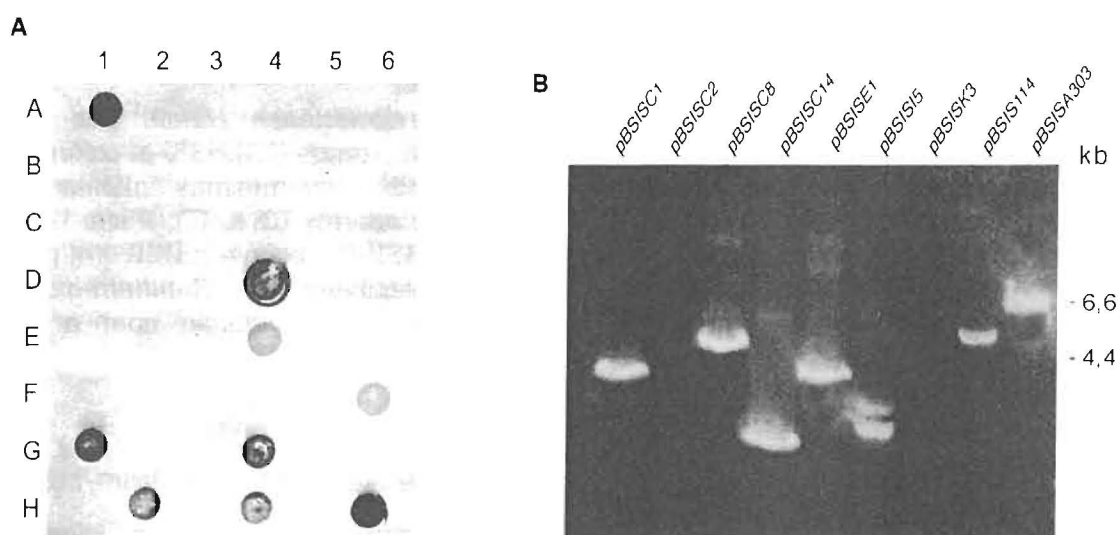
#### **4.3.2 – Selecção de clones recombinantes com a sequência IS1296**

A selecção de clones possuindo a sequência IS1296 foi feita utilizando diversas abordagens, visto que a clonagem do fragmento desejado se revelou difícil. Assim, começou por se fazer a selecção preliminar por repicagem de colónias recombinantes de cor branca simultaneamente para membrana e placa de LB, seguida de hibridação com a sonda COLH35 marcada com digoxigenina (4.2.7), ou por transferência de todas as colónias para membrana por réplica, seguida de hibridação com a mesma sonda. Por este processo, foram seleccionados 571 clones positivos que foram reavaliados por PCR com os iniciadores T3 e T7, de modo a determinar a dimensão do fragmento inserido. Seguiu-se a confirmação final por restrição dos clones, com inserção de cerca de 6 kb, com as endonucleases *Hind*III ou *Pst*I e *Xho*I, transferência para membrana e hibridação com a sonda IS1296P1L-R (4.2.7).

Devido à dificuldade de interpretação dos sinais de hibridação sobre colónias, uma vez que se seleccionaram alguns clones que se verificou por *Southern-blot* não conterem a sequência IS1296, aumentou-se o grau de selectividade inicial utilizando o método de hibridação por *dot-blot*. Esta hibridação foi feita com DNA ou 200µl de cultura em meio líquido de clones que pareciam ter dado resultado positivo na hibridação com colónias. Com esta

segunda selecção reduziu-se o leque de clones a serem submetidos a PCR, com os iniciadores T3/T7, e a *Southern-blot*.

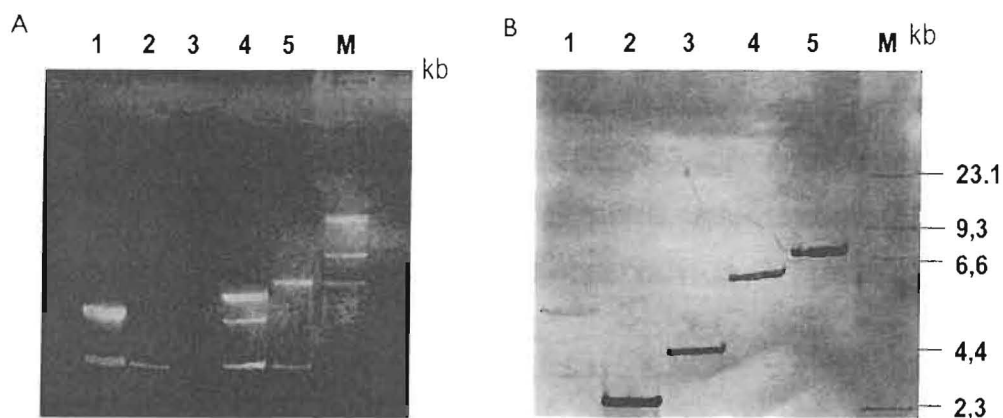
Alguns clones analisados por *dot-blot* com a sonda IS1296P1L-R estão representados na Fig. 4.4. Esta sonda foi utilizada como alternativa à sonda COLH35 visto ter uma dimensão de 1250 pb, superior à dimensão da sonda COLH35 com 771 pb, hibridando com uma região maior do genoma.



**Figura 4.4- A-** Selecção de clones recombinantes por hibridação *dot-blot* com a sonda IS12961L-R marcada com digoxigenina. O clone pBSISA303 possuindo um inserto de 6,5 kb com o elemento *IS1296*, foi utilizado como controlo positivo. A1- clone pBSISA303; D4- clone pBSISC14; E4- clone pBSISC8; F6- clone pBSIS114; G1- clone pBSISC1; G4- clone pBSISI5; H2- clone pBSISE1; H4 – clone pBSISC2; H6- clone pBSISA303. **B-** Amplificação, por PCR com o par de iniciadores T3/T7, das sequências clonadas nos DNA plasmídicos seleccionados. O clone pBSIS114 foi o único que apresentou um fragmento clonado com a dimensão pretendida .

O DNA plasmídico de cada um dos clones recombinantes com a inserção de tamanho adequado foi então hidrolisado com a endonuclease *HindIII*, transferido para membrana e hibridado novamente com a sonda IS1296P1L-R (Figura 4.5).



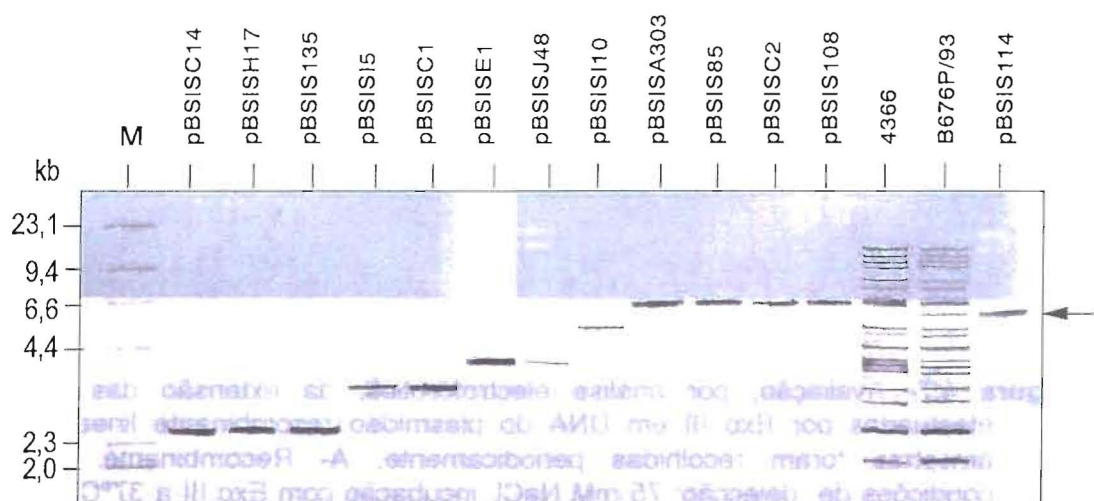


**Figura 4.5- A-** Análise da hidrólise com a endonuclease *Hind*III dos clones seleccionados por hibridação *in situ* entre a sonda COLH35 e colónias de recombinantes, por hibridação do DNA plasmídico das mesmas colónias com a sonda IS1296P1L-R e por PCR com os iniciadores T3 e T7. Pista 1- clone pBSISC8; pista 2- clone pBSISC14; pista 3- pBSISI5; pista 4- pBSIS114; pista 5- pBSISA303; M- marcador de pesos moleculares. **B-** *Southern-blot* dos fragmentos obtidos por hidrólise com *Hind*III e hibridação com a sonda IS1296P1L-R.

Os vários clones obtidos neste processo de selecção permitiram construir um banco com seis representantes dos dezanove fragmentos *Hind*III do genoma da estirpe B676P/93 que, com base nos resultados anteriores, contêm a sequência IS1296 ou parte dela (Figura 4.6). O DNA do clone pBSIS114, exemplar único do fragmento de 6,1 kb positivo na hibridação com a sonda derivada de IS1296, foi sequenciado.

#### 4.3.3 – Estratégias de sequenciação

Tentou-se sequenciar o fragmento inserido no clone pBSIS114 utilizando os iniciadores IS1296S1 e IS1296S2 que hibridam nas extremidades de IS1296 e permitem a sequenciação das regiões flanqueadoras adjacentes a este elemento IS. Com esta estratégia apenas se conseguiu obter sequências com inúmeras ambiguidades, que impossibilitaram a construção de uma sequência correcta necessária ao desenho de iniciadores para se proceder à sequenciação pelo método de *primer walking*.

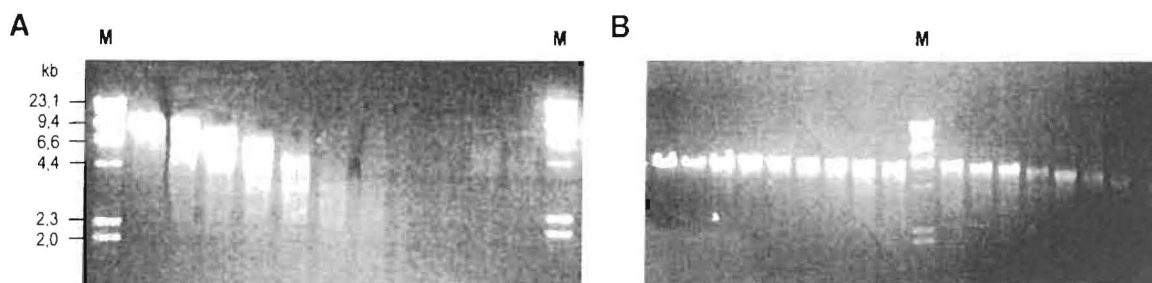


**Figura 4.6-** Resultado da hibridação entre a sonda marcada IS1296P1L-R e o DNA de alguns clones isolados, após hidrólise com a endonuclease *Hind*III. Estão também apresentados os perfis *Hind*III da estirpe B674P/93 e de outra estirpe portuguesa, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC 4366. A seta indica o fragmento de 6,1 kb. O plasmídeo recombinante pBSIS114 contém o fragmento de 6,1 kb clonado de B676P/93.

Optou-se, por isso, pela sequenciação com os iniciadores marcados complementares às sequências dos promotores T<sub>3</sub> e T<sub>7</sub> localizados no vector. No DNA do clone pBSIS114 contendo o fragmento de restrição *Hind*III da estirpe B676P/93, com cerca de 6,1 kb, foram efectuadas deleções uni-direccionais. Após o tratamento com Exo III e nuclease S1, as construções foram recircularizadas e utilizadas para transformação de células de *E. coli* XL1Blue MRF' competentes. Do banco de transformantes delectados, seleccionaram-se clones contendo fragmentos de tamanhos decrescentes, com dimensões adequadas à sequenciação de todo o fragmento (Figura 4.7).

Deste modo, o clone pBSIS114 foi hidrolisado com as enzimas *Sac*I e *Sma*I que geraram, respectivamente, um extremo 3' protuberante, protegido da digestão com Exo III, próximo do local complementar ao iniciador T<sub>3</sub>, e um extremo rômbico, susceptível à digestão com Exo III, próximo do fragmento clonado, que assim foi delectado no extremo esquerdo.

Na Figura 4.7 exemplifica-se os resultados das deleções obtidos a diferentes tempos.



**Figura 4.7-** Avaliação, por análise electroforética, da extensão das deleções efectuadas por Exo III em DNA do plasmídeo recombinante linearizado. As amostras foram recolhidas periodicamente. **A-** Recombinante pBSIS114, condições de deleção: 75 mM NaCl, incubação com Exo III a 37°C, intervalos de colheita de 6 min. A primeira amostra, colocada imediatamente à direita do marcador  $\lambda$ HindIII, foi colhida no tempo zero e representa o plasmídeo recombinante linearizado não delectado. **B-** Recombinante pBSIS114, condições de deleção: 75 mM NaCl, incubação com Exo III a 37° C, intervalos de colheita de 3 min.

#### 4.3.4– Análise da sequência nucleotídica do fragmento de DNA inserido em pBSIS114

##### *Comparação com outras sequências nucleotídicas*

O fragmento clonado, com 5603 pb e extremos *Hind*III, apresentou um conteúdo molar em G+C de 25% (programa GEECEE), o que está de acordo com a percentagem global em genomas de espécies do género *Mycoplasma* que possuem uma percentagem de G+C entre 23 e 40% (Razin *et al.*, 1998).

A comparação da sequência total do fragmento de 5,6 kb com outras sequências publicadas, usando os programas BLAST (Altschul *et al.*, 1997) e FASTA (Pearson & Lipman, 1988), revelou uma identidade de 99,7% com uma de cinco cópias sequenciadas do elemento de inserção IS1634 (Vilei *et al.*, 1999). Com as restantes quatro sequências de IS1634, a identidade variou entre 94,0 e 98,8 %. Esta identidade verificou-se entre os resíduos nucleotídicos 2903 e 4775.

A região localizada entre os nucleótidos 1429 e 2269 apresentou 95,6 % de identidade com uma sequência de 847 nt (CONTIG MC043) de *M. capricolum* subsp. *capricolum*, de função desconhecida.

Com base nestes resultados prévios, foi possível concluir que, contrariamente ao esperado em função dos resultados da selecção de clones

recombinantes, o fragmento de 5,6 kb (clone pBSIS114) não possuía a sequência de inserção IS1296, mas sim uma cópia da sequência de inserção IS1634 identificada em *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Vilei *et al.*, 1999). Esta sequência de inserção com 1873 pb, localizada entre os resíduos nucleotídicos 2904 e 4776 do fragmento (Figura 4.8), possuía algumas diferenças em relação a outras cópias conhecidas de IS1634 de outros *loci* das estirpes L2 e Afadé de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Vilei *et al.*, 1999).

As repetições directas foram encontradas pelo programa REPEAT (GCG) e as repetições invertidas pelo programa PALINDROME (EMBOSS). Os programas FRAMES (GCG Wisconsin Package) e ORF Finder (NCBI) permitiram localizar as grelhas de leitura aberta. Com o programa MAP foram feitas as possíveis traduções, em seis grelhas de leitura, do fragmento de 5,6 kb. Foram consideradas apenas aquelas traduções que especificavam polipéptidos com dimensão significativa (> 16 kDa) com base nos resultados de perfis proteicos de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Ferreira & Duarte, 1990; Gonçalves *et al.*, 1998).

Uma vez que o organismo em estudo utiliza um código genético diferente da maioria dos organismos, os programas MAP e FRAMES foram formatados para conterem a tabela de tradução específica para Fungos, Protozoários, Coelenterados, Mitocôndria e Micoplasma/Spiroplasma. O código difere essencialmente, em relação ao código universal, no codão TGA que codifica o triptofano em vez de representar um codão de paragem da tradução. Para além disto, os codões ATT, ATC e ATA, codificantes da isoleucina, podem ser usados como codões de iniciação em alternativa ao habitual codão ATG que codifica metionina. Os codões TAA e TAG são utilizados como codões de finalização da tradução.

A sequência de resíduos nucleotídicos do fragmento de DNA no clone pBSIS114 está apresentada na Figura 4.8, na qual se indicam as grelhas de leitura aberta e respectivos polipéptidos codificados.



1 AAGCTTAAATTTGCTGGTAAACAAATTCAGTTGATTCAAGTTCAAAATCAATTAAAGAACAAATTAATCATGAGGGTATAGTGTTCAGATTCAAGC 100  
ORF1L114

101 ACTAGATCATTTACTTAATTTTAAAGGAAAGATAAATAATGAAAAATTTAAATAAATTAATGTTAAATTTCTTCATCAATTTACTATTGCACATTAC 200  
M K K F N K L L M L I S S S T L L I P L T

201 TTTACTTGTTCCTTGTAAACCATCACTAGAAAACTACTAATAAACCTTTAAATGAATGAGTTTATAAATTTAGTTGATTCATTAAATGAAAT 300  
L L V S C K P S T R K T T N K P L N D N E F I N L V D S I N N E N

301 GATATCTAAAGTATGCTGATATTAAAGTTTAAAGATCATCAATGATTGATTAAGTAAAGAAAGCTTTTACCTACAGATTAAAGTAATGATATAT 400  
D I L K Y A D I K F K D P S G D L I S K E S V L P T R L S N N D I S

401 CAATCACTTTAAAAATAGATATGAAAAAAGTTAATGCTAGCTTATATATAAAAAATCGAAGCTCTGATAATCCATTTCTGTAGTAAGTATGCT 500  
I T F K N R Y E K Q V N A S V T N I K I E H S D N P F S V V N D A

501 TACCATTTTATTGAATTTAAAAATGCTTCAACAAATAAATCAAAACCAAAAGTTTAAATTAACCTGGTTTAAATACFAAAAAATACAGTTGATAGATCT 600  
T I F I E F K N A S T N K S K T K S F K I T G L N T K N T V D R S

601 GGTCTAAAGTAATTTGATGAATTAGTTTATTTTGGTGTAAACAGGTTTATACAAATATACAAATAATAGTCAAAAGAAAGATTAAATTTGATAATG 700  
G H K V I D E L V Y F G G E T G Y T K Y T N N S Q K E R F K F D N D

701 ATAAATACATTTCTAGACTAGAACTGAATTTGGTGGATTAAGGCTCTATTGATTAAAAAGATTAGAGGATTAGAACTAGTGTAAATGATATTAA 800  
K Y I S R L E S E F G G S K G S I D L K R F R G L E S S V N D I K

801 AAACCTTGATAACAAGCTGAATCAAGCAATTTTGATAGTTATTATATGCTGCATTAAAGGGATTAGCTTACCTGTTTATAAGATGGTAAAGTTGAT 900  
N F D K Q A E S S N F D S Y Y N A A L K G F T L P V Y K D G K V D

901 GGATTAAAAATCAATGATGCTTCAGAGACTATAAAGGCTCTTCGCCAATTTGATCTAGGTAGAAATGAAAAACCAAAATTAATGAGCTAGCTAGAA 1000  
G L K I N D A S E T I K G P S P I D S L G R I E K A K T N G L A R T

1001 CTATACCAATGAAACATATAAGACAGCTGCTATTCAAACCTTTTCAAGTAAGTTTAAAGGTTGAAAGATTATGCTCAAGAAATAGCTGAGGCTGAATA 1100  
I P N E T Y K T A A I Q T F Q V S F K G \* K D Y A Q E I A E A E Y

1101 TTATATAAATTTATTTGAAAGATGAAGTGAATCAAAATTAAGCAATATATTGCTAGACAATTATGACAATTAGAAACAAAATCTTAATATGACTTAAT 1200  
Y I K L F E R \* T D D Q I K Q Y I A R Q L \* Q L E Q N L K Y D L N

1201 TTAGTAGAAAAAGATATTGCTCAACTGATCTGAGTTAATTACAGTAATTAAGGATTAAATGATAAAAAAGAACAAATTAAGAAAGATTATGAAAAAGA 1300  
L V E K D I A T T D P E L I T V I K G F N D K K E Q L K K I M K K K

1301 AAGCAAGATTATCTCTTTAAAAAAGATGAATTAGTTCAATGACAACGAAGAAGAAATGAAAAATATAAAGAAAAAGAAAGAAAGATTTTTCAAAC 1400  
S K I I F F K K D E L V Q \* Q Q E E I E K Y K K K K E E K I F Q T

1401 TTCAGAATCTGGAACATGGAATTAATGGATTTTATTAATGAAATAATAATAAACTCAACCAAGTTTATTTTGGACAAATTCACACGTTGCTAAA 1500  
S E S G T M \* I M D F I N E N N N K T P T K F Y F G T N S H V A K

1501 GCTATAAAGATGATTTAATTTTCAAGTTTCATTAACTAGAAATTAATTCAGATTAATGTTGGTCAAACCTTTAATATAAATAGTTTGTAAAACTTTA 1600  
A I K D D L I S V S L T R I N S D I N V G Q T F N I N S F D K N F T

1601 CAACTTTTACATTTGAAGCACAAGAAAAATAAGCAAAATAGTAATGCTGTTACTGCTATTATCATGCAACTGACTTATAAAAAAGAAAGTAGCC 1700  
T F T F E A Q E N K S K I S N A V T A I Y H A T D F I K K E S S P

1701 AGTTGAATGCTAGAAAAAGAACAAAAAGAAAAATATAGGATGCTGGAATATTGCTGATTTGCTGTTATTGAAATAGATTGTAAGAACTATTAAAA 1800  
V E L L E K E Q K E K Y K D A G I F A D F A V I E I D F E K L L K

1801 ACAGATGATTAACAACGTTCTATTGAAATGAAAAAACTGAAATTTCTGATAAATCTCCAGTGATCAAGAAGCATTAAATAAAAAAATTAATTAATGATT 1900  
T D D Y K R S I \* N E K T E I S D K S P S D Q E G L I K K I T N D Y

1901 ATCAAAATAGTAATCTAAAGTTCAATTTGAATTAATTCGCTATTAGAAGATCAATTTATTAATACATTTGATAGAAAACCTTGATTTTAAATCATAACA 2000  
Q N S K S K V Q F E S N S L L E D Q F Y N T F D R K L D F N H N K

2001 ACCTGAAGATGTAAGAACTATAGAGATTAAATAGTTTATATTTTAAAGTTATCTCTTCAAGAGAAAGATCATTATTAGAAAAATACTATGACCAA 2100  
P E D V K N Y K D L N S F Y I L G Y P S S K E D H Y L E K Y Y D Q

2101 AAGCAATTGATTAACAAGAAATATGATTTTCAATTAGTAAGTAAGTGAATATAAATATTATAGATATAGTGAAGAAAGAACTTAACTAGTTTAT 2200  
K Q L D Y Q K Y A D F S L \* V N S E Y K Y Y K N I V K K E G Y T S S F

2201 TTAAGATTATGAAGTGAAGAAAGAAATTTCTTATCATATCAAAATGAGATATAGATCATTTATAGATAAAGCAAGGATTAACTGATGATTTTATGAGT 2300  
K D Y E L E K G N F L S Y O I G Y R S F I D K P G L T D A F L A V

2301 TCATGAATGATTAATGATTTATATAGCTTTATGATGAAAAAGAAAAAAGGTTAAACATTACTTTAATTAAGGATTAGAAATATACCAAGATTTTAT 2400  
H R I G N D L Y T L Y D E K E K K V K H Y F N Y G L E I L P R F Y

2401 GCAATGCTGCTGCTAGTGTATGATTTTAAATGAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 2500  
A P A G G A S G S S V R T K D N K L I A V F H A A N Y V A K T G L A

2501 CTGCAATATTATGATTAATGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 2600  
A T F R S N G Y D Y N N L F G N Y K L G Q Y D L I Y G G G K D Q I

2601 TAGTGTATGATTTATAGAAAGTTATGCAAAATTAATTAAGATTAAGAAAGGTTGATTTTCTGAAAGTTTAAATTAATTAATTAATTAATTAAT 2700  
S G R S Y R E V M Q K L Y K D K K S A L F A N G F N E I P E S F K



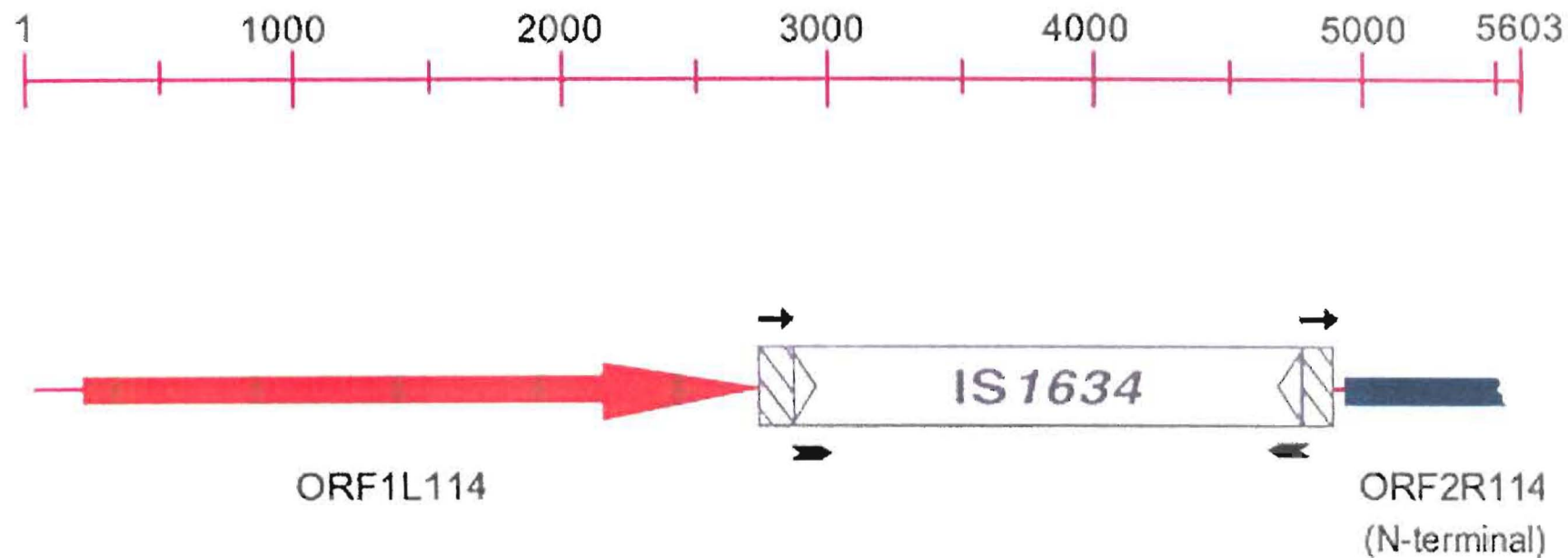
5501 GGTGGTGAAGGTTATGATAAAGGTGCTGATTATTTAAAAATACACTAACAAATGTTATTAGTAGAGAAATTGAGCAAAACAAAGGAGATATCCATAAAG 5601  
 G G E G V D K G A G L F K N T L T N V I S R E I E E N R G D I H K A  
 5601 CTT 5603

**Figura 4.8-** Sequência de resíduos nucleotídicos do fragmento de 5,6 kb da estirpe B676P/93. A tradução das regiões codificantes, correspondentes aos genes, foi inferida utilizando o programa MAP do GCG Wisconsin Package (versão 10.0). Sobre os códons de iniciação da tradução (ATG, ATA ou TTA), realçados a azul, nomeiam-se as respectivas grelhas de leitura abertas (ORF1L114, nt 139-2724, ORF2R114 incompleta, nt 4898-5603). Os códons de terminação (TAA) estão também realçados a azul. As repetições invertidas de 13 pb do IS1634 (IR-L e IR-R) estão assinaladas a vermelho e as repetições directas de 115 pb (DR-L e DR-R) a verde. Os códons de iniciação e terminação da tradução da transposase (nt 3057-4535) do IS1296 encontram-se assinalados a azul. (\*) representa codão de finalização.

O mapa genómico da região de 5,6 kb, com extremidades *HindIII*, da estirpe B676P/93 (Figura 4.9) foi elaborado com base na informação obtida por análise da sequência.

#### *Análise comparativa da sequência de inserção IS1634*

Comparou-se a sequência IS1634 do clone pBSIS114 da estirpe B676P/93, com cinco cópias da mesma sequência identificadas na estirpe Afadé (Vilei *et al.*, 1999). As diferenças encontradas em relação às outras cópias de IS1634 incluíram dez substituições e três deleções nucleotídicas (Figura 4.10).



**Figura 4.9-** Mapa genómico do fragmento de 5,6 kb da estirpe B676P/93 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. A caixa aberta indica a cópia do elemento IS1634. A caixa riscada representa as repetições directas de 115 pb e as setas abertas as repetições invertidas de 13 pb, características do IS1634. A montante desta sequência de inserção existe uma ORF, representada por caixa colorida, com forte similaridade com lipoproteínas de outros micoplasmas. A jusante existe a parte N-terminal de uma ORF parcial.



```

1                                     100
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus CCTACGTTTCCCACTTAGTCGCGAABACACTCAGTTTTCAGCGCTATATTTTT--ATAAAAAATATAATTTATTATGCTTTTATGCTTAAATATGAT

101                                     200
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus ATAATAAGACSTGAAGAAGTCAAGAAATGATGTAAAAAGACAATGAAGAAATCAATAGCAAGAGTTAAAAAGGCGAATACTTATCAATTGGAGTGCC

201                                     300
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus AAGACCAGATAACAAAGGTTTTGTATATAGATTGGGATATGGATATTTGCATGAATTAAACAATATCAGCATGATCCGCTAGCAATTATCAAAGCAATT

301                                     400
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus ATTGCAAACTTTCATTGTCTTGAACAAAAGAACAGCAAGAACTAAATTAGATGAAATTTTAAAGAGAAAAAGAAACCAAAAAAGAAAGTTTAGAAA

401                                     500
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus GGTTTAAAGGTTACGAAGTAGTTGAAAAACTATTTGATTATTTCAATATTTTAAATGATTGTTCTCCACAAATCGACAACATTAAGATGTTGTTTT

501                                     600
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus ACAGTTGATTTATCAAAGAATTAAAAATCCAATAAGTGTTTTTAACACTTATAAGACAGCAAAAAAGAAAAATAGACACTCATTCAAAAAATTCATTT

601                                     700
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus TATAGATCATTAGACTATATAGCAAAAAACAAGATGAAATTTTAAGAAATTTAAATGCAAAAAATTTGTGCAATACCAATAGAAAAATGATGTATTAT

701                                     800
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus GATTTGACGCAACAACTACTTATTTTGAACATTTTCTCGTGAAGGTTATAAAAAACCTGGTTATTCAAAGATGGAAAAATTAAGAAAGACCAGATTGT

801                                     900
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus TATAGGTATGGCAACTGATGAAAAATGGAATACCGTTACACTACAAAATATTTCCAGGAAATGTTCTGATCCAAATACTTTAATAACATTATGCTTGAA

901                                     1000
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus ATTGCAGATATTTATGAAGTTAACAGTGTAACATATAATTGCTGACAAAGGAATGAGTGTAAATAGAAATATTAGATTTTTAGAAATCTAAGAATTGAAAAAT

1001                                     1100
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus ACATAATCTCATACAGAATGAAAGCTGGAAGCAACAATTTAAGAGTATATATTAGATGAAAAAGATTATATAAATGATGGTGGTTTGATATACAAAC

1101                                     1200
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus TCGTGATATTGCATCTTCATACATAAAAAAGAATTAAATGGACATTTTAGAAGACAATAATTAGTTTGTCTCAAAAACGAGCAACTAAAGACAAAAAC

```

```

1201                                     1300
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus  GATAGAGACATTTTAATTCAAAATTTCACTAAGAAAATGAATAAGATAATCTTGTTTCTTGATGATTTAGCGGGATCTAAAAATATAGATTCITTA

1301                                     1400
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus  AACCTATAAACAAAGGTGCATTTTATGAACTTGACATAGAAAAATACAAGAAGATCAAAAATATGATGGATACTATGTTTATGAAACAAATAGAACAGA

1401                                     1500
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus  TTTATCAGTAAAAGAAGTTATTAATTTATATTCAAAACAATGACAAATTGAGTCTAATTTCAAGACATTAAAAGGTAAATTATCGGGATCTTCGTCCAAT

1501                                     1600
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus  GTATTTATCAACTTGAAACCATATTTGTTGGTTACATTTGTTTATGTTTCATTTTCATTAGTGTTTTAACTACATCATCTACATTCTAAATTCAAAATTA

1601                                     1700
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus  GGACTGACTGGAAAAAGCAAAATCACTGAGCATAPAGTGATTAATGTTATCAAGAAGTTAAAGAAATTGAAGTATTTGTAAATAACAAAAATCGAAA

1701                                     1800
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus  CTATACAAGTGTATAATGATGAGTTACAAGAAAGTTGGCAAACTTATCAAAATATTATTAGAGCTTTTAAACAAAAGAAAAGTCACCTTAGACATTACATTT

1801                                     1878
AF101410
AF101411
AF101412
AF062493
AF101413
IS114
Consensus  ATAAAAACATAACTTATGAGATCAAAAATTTACATAAGTATGTTTCTTGTTTATGCTTAACTGGGAAACGTAGG

```

**Figura 4.10-** Alinhamento da sequência nucleotídica da cópia de IS1634, designada na figura por IS114, existente no fragmento *Hind*III de 5,6 kb da estirpe B676P/93, com cinco sequências publicadas de cópias do mesmo IS da estirpe Afadé de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (AF101410, AF101411, AF101412, AF062493, AF101413). Na linha inferior está representada a sequência de consenso. Os nucleótidos em letra minúscula correspondem a substituições, os pontos a nucleótidos delectados. Para este alinhamento foram utilizados os programas PILEUP e PRETTY.

A característica mais notória do elemento IS1634 é a existência, no local de inserção, de longas repetições directas de dimensão variável que pode atingir 500 pb. Esta cópia de IS1634 possui repetições directas com 150 pb, entre os nucleótidos 2789 a 2903 e 4777 a 4892, mas já foram observadas outras cópias nas estirpes L2 e Afadé que possuíam repetições directas com dimensões entre 17 e 478 pb (Vilei *et al.*, 1999). Este mecanismo peculiar de originar repetições directas na sequência alvo de DNA no passo inicial de transposição constitui uma característica comum a IS1634 e IS 1549 de

*Mycobacterium smegmatis*, que formam uma nova família de elementos de inserção distinta das outras famílias. Caso as restantes famílias de IS apresentem repetições directas, estas possuem entre 4 a 9 pb e tamanho constante. As repetições invertidas de 13 pb localizam-se entre os nucleótidos 2904 a 2916 e 4764 a 4776.

A sequência aminoacídica da hipotética transposase, analisada com o programa BLASTP, apresentou 97% de identidade e similaridade com a sequência aminoacídica de AF101413, uma das cópias de IS1634 sequenciada na estirpe Afadé de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Vilei *et al.*, 1999). A característica mais notória é a iniciação da proteína por um resíduo de isoleucina (codão ATA) em vez de metionina (codão ATG), o codão de iniciação mais comum na maioria dos organismos. Este estudo permitiu identificar dois possíveis locais para iniciação da tradução, ATA na posição 3057 e TTA na posição 3084. Embora as outras transposases aqui comparadas se iniciem por um resíduo TTA, o que poderá indiciar que também nesta estirpe seja este o codão de iniciação, seria necessário efectuar o mapeamento do início da transcrição, por experiências de *primer extention*, para tentar determinar o real codão de iniciação na transposase do elemento IS1634 na estirpe B676P/93, ou identificar o aminoácido de início da tradução através da análise do polipéptido expresso em *E. coli*. O alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica da transposase do elemento IS1634 clonado e de outras sequências publicadas recolhidas de bases de dados com o programa BLASTP foi realizado com o programa CLUSTAL W (Figura 4.11).

```

transpos2  -----MSIGVPRPDNKGfVYRLGYGYLHELKQYHDDPLAIKAIIANFPLSWTKEQ
transpos3  -----MSIGVPRPDNKGfVYRLGYGYLHELKQYHDDPLAIKAIIANFPLPWTKKEQ
transpos1  -----MSIGVPRPDNKGfVYRLGYGYLHELKQYHDDPLAIKAIIANFPLSWTKEQ
transp     IARVKKGEYLSIGVPRPDNKGfVYRLGYGYLHELKQYHDDPLAIKAIIANFPLSWTKEQ
           ;*****.*****

transpos2  ARTKLDEIFKEKKETKKEVLERfKGyEVVEKLFDYfNIFNDcSPtKSTTLKDVVLQLIYQ
transpos3  ARTKLDEIFKEKKETKKEVLERfKGyEVVEKLFDYfNIFNDcSPtKSTTLKDVVLQLIYQ
transpos1  ARIKLDEIFKEKKETKKEVLERfKGyEVVEKLFDYfNIFNDcSPtKSTTLKDVVLQLIYQ
transp     ARIKLDEIFKEKKETKKEVLERfKGyEVVEKLFDYfNIFNDcSPtKSTTLKDVVLQLIYQ
           ** *****

transpos2  RIKNPISVFNTYKTAKKEKIDThSKNSfYrSLDYIAKNKDEILrNLNAKICANTNRKIDV
transpos3  RIKNPISVFNTYKTAKKEKIDThSKNSfYrSLDYIAKNKDEILrNLNAKICANTNRKIDV
transpos1  RIKNPISVFNTYKTAKKEKIDThSKNSfYrSLDYIAKNKDEILrNLNAKICANTNRKIDV
transp     RIKNPISVFNTYKTAKKEKIDThSKNSfYrSLDYIAKNKDEILrNLNAKICANTNRKIDV
           *****

```

transpos2	LWFDATTTYFETFSREGYKKPGYSKDGKFEDQIVIGMATDENGIPLHYKIFPGNVADPN
transpos3	LWFDATTTYFETFSREGYKKPGYSKDGKFEDQIVIGMATDENGIPLHYKIFPGNVADPN
transpos1	LWFDATTTYFETFSREGYKKPGYSKDGKFEDQIVIGMATDENGIPLHYKIFPGNVADPN
transp	LWFDATTTYFETFSREGYKKPGYSKDGKFEDQIVIGMATDENGISLHYKIFPGNVADSN *****.*****.*
transpos2	TLIPFMLEIADIYEVNSVTIIADKGMVNRNIRFLESKNWKYIISYRMKAGSKQFKEYIL
transpos3	TLIPFMLEIADIYEVNSVTIIADKGMVNRNIRFLESKNWKYIISYRMKAGSKQFKEYIL
transpos1	TLIPFMLEIADIYEVNSVTIIADKGMVNRNIRFLESKNWKYIISYRMKAGSKQFKEYIL
transp	TLIPFMLEIADIYEVNSVTIIADKGMVNRNIRFLESKNWKYIISYRMKAGSKQFKEYIL *****
transpos2	DEKDYINDGGLIYKTRDIASSYNKKRINGHFRRQIISFSQKRATKDKNDRDILIQNFTKK
transpos3	DEKDYINDGGLIYKTRDIASSYNKKRINGHFRRQIISFSQKRATKDKNDRDILIQNFTKK
transpos1	DEKDYINDGGLIYKTRDIASSYNKKRINGHFRRQIISFSQKRATKDKNDRDILIQNFTKK
transp	DEKDYINDGGLIYKTRDIASSYNKKRINGHFRRQIISFSQKRATKDKNDRDILIQNFTKK *****
transpos2	MNKDNLVSCDDLAGSKKYRFFKPINKGAFYELDIKIQEDQKYDGYVYETNRTDLSVKE
transpos3	MNKDNLVSCDDLAGSKKYRFFKPINKGAFYELDIKIQEDQKYDGYVYETNRTDLSVKE
transpos1	MNKDNLVSCDDLAGSKKYRFFKPINKGAFYELDIKIQEDQKYDGYVYETNRTDLSVKE
transp	MNKDNLVSCDDLAGSKKYRFFKPINKGAFYELDIKIQEDQKYDGYVYETNRTDLSVKE *****
transpos2	VINLYSKQWQIESNFKTLKGKLSLRPMYLSWNHIVGYICLCFISLVFLN-YIIYILNSK
transpos3	VINLYSKQWQIESNFKTLKGKLSLRPMYLSWNHIVGYICLCFISLVFLN-YIIYILNSK
transpos1	VINLYSKQWQIESNFKTLKGKLS-GTVPNVFINLKPVCWLHLFMEHFISVFKLHLHLSK
transp	VINLYSKQWQIESNFKTLKGKLS--GTVPNVFINLKPVCWLHLFMEHFISVFKLHLHLSK ***** ..: : * : : *.. : : *:**
transpos2	LGLTGKSKITEHKVINVIKEVKEIEVFVNKQKIETIQVYNDELQESWQTYQILLELLTKE
transpos3	LGLTGKSKITEHKVINVIKEVKEIEVFVNKQKIETIQVYNDELQESWQTYQILLELLTKE
transpos1	FKIRTDWKKQNHWA-----
transp	FKIRTDWKKQNHWA----- : : . * : *
transpos2	KVT
transpos3	KVT
transpos1	---
transp	---

**Figura 4.11-** Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica da transposase do IS1634 clonado (transp) e de três sequências aminoacídicas de transposases de três diferentes cópias de IS1634 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Símbolos: (\*) assinala posições absolutamente conservadas (identidades); (:) assinala posições fortemente conservadas resultantes de substituições entre resíduos pertencentes aos grupos STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW (similaridades); (.) assinala posições relativamente conservadas resultantes de substituições entre resíduos pertencentes aos grupos CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, FVLIM, HFY (similaridades); (-) assinala ausência de resíduo. O programa CLUSTALW foi utilizado para o alinhamento das sequências apresentadas. Cada linha totalmente preenchida corresponde a 60 resíduos.

#### *Análise das sequências polipeptídicas inferidas*

A sequência aminoacídica de cada um dos polipéptidos inferidos foi obtida pelo programa EXTRACTPEPTIDE. A caracterização de cada polipéptido foi efectuada recorrendo ao programa PEPSTATS. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3-** Propriedades dos três polipéptidos putativos

Polipéptido	Massa molecular (kDa)	Nº total de aminoácidos	Nº aminoácidos polares	Nº aminoácidos não-polares	Aminoácido predominante
ORF1L114.pep	98,9	863	482	381	Lisina
ORF2R114.pep	26,0	233	124	109	Lisina
TRANSPOSASE	58,1	492	258	234	Lisina

\*Esta região corresponde ao terminal amino do polipéptido, visto a ORF ter sido truncada devido à hidrólise do DNA com *HindIII*.

Da análise da composição dos três polipéptidos, dos quais o potencialmente codificado pela ORF2R114 se encontra truncado na extremidade C-terminal, ressalta a riqueza em aminoácidos polares de que a lisina é exemplo.

A comparação destas sequências com as sequências polipeptídicas disponíveis em bases de dados, usando o programa Advanced BLAST, revelou que uma região do polipéptido ORF1L114.pep apresentou homologia significativa (62% de similaridade) com uma putativa lipoproteína de membrana de *Ureaplasma urealyticum* (Glass *et al.*, 2000), com uma hipotética lipoproteína conservada de membrana de *M. capricolum* subsp. *capricolum*, (55% de similaridade) e com uma lipoproteína (53% de similaridade) de *Mycoplasma pulmonis* (Chambaud *et al.*, 2001).

```

lipocapORF1      154 HGRIVGNQYAYFGPDGFEKYLKLNQERFDNDKKYMEILERSLQVDNKNKVETI
lipompulORF1     234 -----EYVAANSLERFHKDNPKYLDILKRQLGAGN---FDIT
urelORF1         243 ENGTIPGIGTERLKPKNQDDYFSKTQLQRYEIDNEGYLQILKRQNNNDKN---W--K
ure2ORF1         299 -----QYNNADQQTRYLYDNENYLSKSLKAYQRNVN---W--Y
ORF1L114         154 SGHKVIDELVYFGGETGYTKYTNSQKERFKFDNDKYISRLESEFG-GSKGSID-L
                        . *      * :  * *  * : .  * :

lipocapORF1      KKQRNIEIKDTDIEKFDKLAKEVKFDNYNSALKGFTLPVYDDQGVKGLKVNDADEVGK
lipompulORF1     KYREDIKRNSTAESSEFDKKAKELNQDSYENQLVKGFTVPVYDQSGKNLGLNIKE-ETVVK
urelORF1         ELRPDLNATVSDIKHFEDEKAKNVGQDSYESAAYKGFTLPVYESDGKISGLALAG-KDTPK
ure2ORF1         QIRQDLINNKQKINEFDQKAPQVFQDSYESAARKGFTLPVYDEEDGKYQGLSFNE-TEIGK
ORF1L114         KRFRGLESSVNDIKNFDKQAESSNFDSTYNAALKGFTLPVYKD-GKVDGLKINDASETIK
: . : . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
                        : . : . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

lipocapORF1      GSSVIDSLGR-NPHRTNGLARTIPNETYKKIATQTFQVT-FRSPNLYEEIEEEANE 323
lipompulORF1     GPSWVDSVNR-NSYSVAGLARTLPNEMYKKIALQTYSDVDFNPKKNANGEIEDAKV 381
urelORF1         GPSWVDAIGR-NQWQIGGLPRTLPLNEKYRQEQAMQTFSLGILNNDSHKNNT-YNKTA 406
ure2ORF1         SVSWVDAIGK-DQWKINGLARTLPNDMYKQIALQTFGIQI-QTPNGKPRE-SDVVA 442
ORF1L114         GPSPIDSLGRIEAKTNGLARTIPNETYKTAATQTFQVS-FKGWKDYAQEIAEAEY 323
. * : : : : : : . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

```

**Figura 4.12-** Alinhamento múltiplo da sequência polipeptídica inferida a partir da região N-terminal de ORF1L114, da sequência polipeptídica de uma lipoproteína putativa de membrana de *M. capricolum* subsp. *capricolum* (lipocapORF1), da sequência polipeptídica de uma lipoproteína putativa de membrana de *M. pulmonis* (lipompulORF1), da sequência polipeptídica de uma hipotética

lipoproteína de membrana de *U. urealyticum* (ure1ORF1) e da sequência polipeptídica de uma hipotética proteína de ligação a ATP/GTP (ure2ORF1). Símbolos: ver legenda da Figura 4.11. O programa CLUSTALW foi utilizado para o alinhamento das sequências apresentadas. Cada linha totalmente preenchida corresponde a 60 resíduos. As setas indicam-se porções conservadas, relativamente à sequência aminoácida da estirpe portuguesa, em pelo menos três das quatro sequências analisadas. Os números no início e final das sequências alinhadas referem-se à posição dos aminoácidos nos polipéptidos completos.

A região N-terminal do polipéptido ORF2R114 apresentou 56% de similaridade com uma hipotética proteína de *U. urealyticum*. O alinhamento múltiplo, utilizando os programas PILEUP e CLUSTALW, dos produtos resultantes da tradução deduzida de cada uma das ORF (Figuras 4.12 e 4.13) compara-os com sequências aminoácidas com as quais apresentaram homologia, recolhidas de bases de dados com o programa BLAST.

```

ORF2R114      8 VYFVKKKKNKILYALLASLATSLSFGSVIYYSFSDANISFETSSNGITDAELTPINNA
ureapurea3    1 MKFI-KRKTKLLTITIGAVAVSSILLGGIFYGTSQKSPSSFGIASIDQKENFINKDNL
   : *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
ORF2R114      TNDVVSNRDNKL----KPNPEKIIKESEKQEPNKL-IIPKKEE---KEIK--EVAKP
ureapurea3    YQKARPSIKDSNLKEIPKPKPQPKPKPQPTPFDPPIPTPKKEELKKPDIKPEEPK
   : . * * : . : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * *
ORF2R114      KPE-----IIRP-----ETLKPSTTRVTK-----III
ureapurea3    KPEPKPEPIPPAPPPIETKPEELLPPNPPPKPEPKPEPNPQPQPQVPNNSNSRI
   ***      * : *      * * * : * . . : . *      * *
ORF2R114      NGVTVD AEIEAPPGFVVPNDKTRNIANPTKPYQNHIVEKILSIEVTQALRDSVIKNSLT
ureapurea3    NGVRVEAEVEVPPPRDIAEYDKQNNLVNP-NPYINDSVGKIKNVKVTDELRRATGK--LV
   *** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
ORF2R114      GGEYDKGAGLFKNTLTNVISREIEENKGDH 234
ureapurea3    QG---NLGRWDYKHLINDLLTLKPEEIEKYVK 264
   *      : *      : * : : : : : * * : :

```

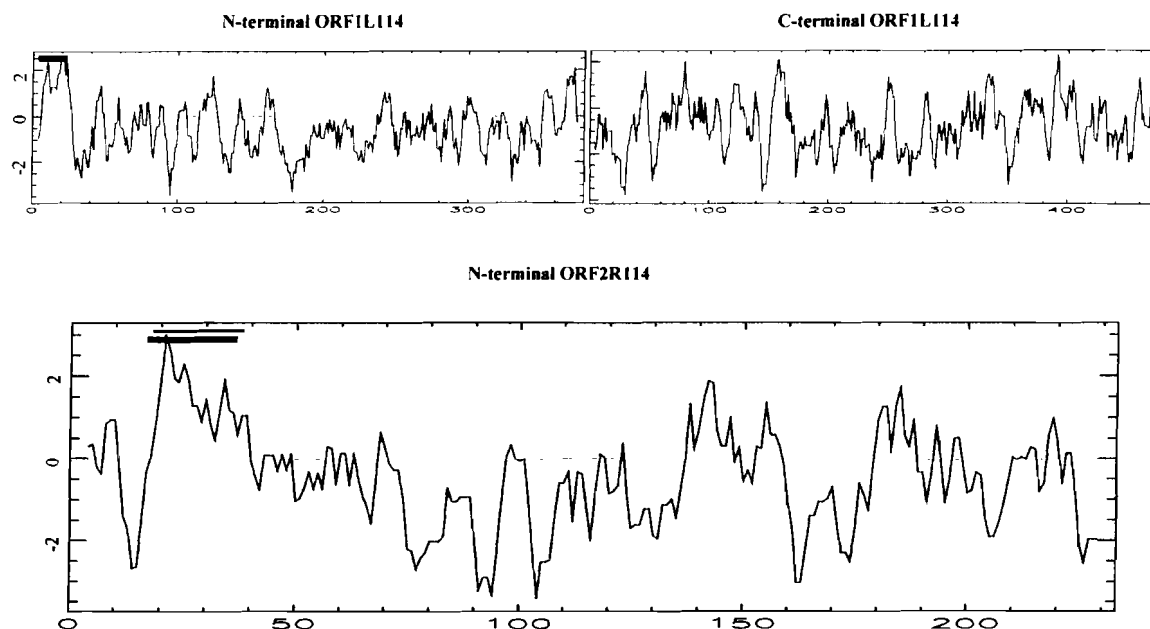
**Figura 4.13-** Alinhamento da sequência polipeptídica da região N-terminal inferida da ORF2R114 parcial e da sequência polipeptídica de uma hipotética proteína de *U. urealyticum*. A restante informação relativa a esta figura pode ser consultada na legenda da Figura 4.11.

As percentagens de similaridade entre as sequências polipeptídicas deduzidas das ORFs e as sequências com as quais apresentaram homologia foram determinadas pelo programa GENEDOC e BLASTP com base nos alinhamentos representados nas Figuras 4.12 e 4.13.

Os perfis de hidropatia dos dois polipéptidos putativos foram obtidos pelo método Kyte-Doolittle com recurso aos programas PEPWINDOW (EMBOSS), e estão representados na Figura 4.14. Domínios transmembranares potenciais,

ou regiões hidrofóbicas de proteínas globulares, foram identificados pelo programa TMAP (EMBOSS). Para obter mais informação relativa à hipotética função destes polipéptidos, utilizou-se o programa SIGCLEAVE que prevê a existência de péptidos-sinais que correspondem às sequências que antecedem locais de clivagem do polipéptido reconhecidos por peptidases. No hipotético polipéptido ORF1L114.pep foram detectados dois possíveis sinais de clivagem nos resíduos aminoácidos 20 e 27, e uma região de péptido-sinal que se estenderia até ao resíduo 27. Por sua vez, a região N-terminal do polipéptido ORF2R114 apresentou quatro possíveis locais de clivagem nos resíduos aminoácidos 31, 32, 33 e 35. Foi identificado um domínio transmembranar entre os resíduos aminoácidos 18 e 35 que poderá funcionar como potencial péptido-sinal.

A identificação de uma lipoproteína baseia-se nas seguintes características: i) um ou mais aminoácidos básicos nos sete primeiros aminoácidos da extremidade amina; ii) uma sequência péptido-sinal hidrofóbica, e iii) um resíduo de cisteína imediatamente a jusante da sequência péptido-sinal, que permite a modificação da proteína por transferência do radical diacilgliceril do glicerofosfolípido para o grupo sulfidrilo do aminoácido (Himmelreich *et al.*, 1996). Estas características localizam-se, portanto, na região N-terminal do polipéptido, sendo, assim, possível concluir que tanto o polipéptido ORF1L114.pep como ORF2R114.pep possuem características de lipoproteínas.



**Figura 4.14-** Perfis de hidropatia (método Kyte-Doolittle) dos polipéptidos inferidos das ORF1L114 (N-terminal e C-terminal) e ORF2R114 (N-terminal), obtidos pelo programa PEPWINDOW. Os potenciais domínios transmembranares, identificados pelo programa TMAP, estão representados por barras negras.

#### 4.4 – DISCUSSÃO

A selecção de clones recombinantes, com um fragmento inserido de aproximadamente 6,1 kb que hibridasse com a sonda marcada baseada no elemento de inserção IS1296, revelou-se difícil e só após a análise de 571 clones se considerou detectado o clone desejado, designado por pBSIS114. Contudo, a análise da sequência deste clone revelou que, contrariamente ao esperado, não possuía o elemento de inserção IS1296, mas sim o elemento IS1634. Existem várias hipóteses plausíveis que poderão explicar esta observação. A sequência de inserção IS1634 existe em número de 30 a 40 cópias por genoma, o que aumenta a probabilidade de, inadvertidamente, isolar colónias com esta inserção que estejam muito próximas de colónias com a inserção IS1296 e que deram resultado positivo na hibridação. Contudo, a hibridação *Southern blot*, feita com a sonda específica IS1296P1LR na etapa final de selecção de clones ( Figuras 4.5 e 4.6), apresentou sinal positivo com o



clone pBSIS114 o que elimina esta hipótese. A possibilidade de existência de um clone que representasse uma mistura de dois clones foi, aliás, inviabilizada ao fazer-se o re-isolamento de colónias do recombinante pBSIS114, que deram resultado positivo na hibridação de colónias. Comparando as sequências de IS1296 e IS1634, utilizando o programa BESTFIT, obteve-se uma similaridade entre elas que variou entre 77,5% e 90,1% consoante os parâmetros utilizados (*gap weight/length weight*) foram, respectivamente, 50/3 ou 10/1. Estes alinhamentos não eram, contudo, perfeitos, visto existirem muitos espaços entre as bases complementares, nunca se obtendo entre as duas sequências mais de nove nucleótidos seguidos com bases complementares. Neste caso, a hibridação do fragmento clonado com a sonda derivada de IS1296 poder-se-ia ter verificado se as condições de hibridação fossem pouco estritas, o que não foi o caso. Também a comparação da sequência da sonda COLH35, usada em algumas hibridações e baseada também na sequência de IS1296, com a sequência do elemento IS1634 revelou 73% de identidade do nucleótido 22 a 66 da sonda, o que confirma que só em condições pouco estritas poderia ocorrer hibridação entre as duas sequências.

Por outro lado, a interpretação dos sinais de hibridação é, por vezes, equívoca, podendo esta dificuldade ser minimizada usando sondas marcadas com isótopos radioactivos. Um sinal de hibridação mais fraco poderia, contudo, significar uma sequência de IS1296 truncada por uma cópia de IS1634, como se verificou numa cópia desta última sequência de inserção na estirpe Afadé que apresentou cópias incompletas das duas sequências de inserção (Vilei *et al.*, 1999). A ocorrência, fora do comum, desta cópia adicional de IS1296 na estirpe B676P/93 poderia ser explicada por um fenómeno semelhante, e daí a dificuldade de selecção do clone recombinante desejado. Contudo, a sequenciação veio também provar que não foi esse o caso.

A preparação de sondas baseadas nas sequências flanqueadoras do elemento IS1634 do fragmento de 5,6 kb e a sua utilização em hibridações com DNA genómico da estirpe B676P/93, digerido com *HindIII* e transferido por *Southern blot*, poderia eventualmente confirmar se este fragmento é ou não o mesmo que se observa nas hibridações usando sondas baseadas no IS1294. O esclarecimento desta situação poderia também ser feito, através de uma

primeira hibridação do DNA genómico da estirpe B676P/93 digerido com *HindIII*, com uma sonda não marcada baseada no fragmento de 5,6 kb, seguida de hibridação com uma sonda marcada baseada no IS1296. Caso a banda extra do padrão da estirpe B676P/93 ficasse bloqueada na primeira hibridação, era porque correspondia ao fragmento de 5,6 kb e, portanto, não daria sinal de hibridação com a sonda marcada baseada no elemento IS1296.

A sequenciação do fragmento clonado veio fornecer mais dados sobre o genoma de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e revelar a existência de regiões nele existentes com potencialidades para o desenvolvimento de testes de diagnóstico.

O genoma de *M. pulmonis*, recentemente sequenciado, possui um conteúdo molar de G+C de 26,6% (Chambaud *et al.*, 2001), o que constitui, em conjunto com *U. urealyticum* que tem um conteúdo de 25,5% (Glass *et al.*, 2000), as percentagens mais baixas até agora verificadas em bactérias. O fragmento de 5,6 kb sequenciado do genoma da estirpe portuguesa B676P/93 de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, com uma percentagem de G+C de 25%, está de acordo com a regra de que os membros da classe *Mollicutes* possuem um baixo teor em G+C, o qual nos membros do género *Mycoplasma* varia entre 23 e 40% e nos membros do género *Ureaplasma* entre 27 e 30% (Razin *et al.*, 1998).

A análise da ORF completa (ORF1L114) e da ORF parcial (ORF2R114), assim como a sua tradução conceptual nos polipéptidos ORF1L114.pep e ORF2R114.pep, revelou grande homologia com lipoproteínas de membrana. As previsões relativamente às características, localização e função na célula dos dois polipéptidos foram feitas, essencialmente, com base na comparação com outras sequências polipeptídicas existentes nas bases de dados. Para a maior parte das proteínas de membrana conhecidas, a sequência de aminoácidos, derivada da sequência de DNA, é, normalmente, a única informação existente relativa à sua estrutura. Contudo, estes resultados são meras hipóteses e servem de base para a planificação de análises bioquímicas, genéticas e espectroscópicas que complementam os dados preliminares e permitem comprovar as hipóteses. Em conjunto com os

métodos de análise computacional de sequências de resíduos aminoacídicos, pode-se, assim, obter uma estimativa grosseira da possível função e orientação na membrana de uma certa proteína. A análise dos polipéptidos ORF1L114.pep e ORF2R114.pep foi completada com programas que permitiram avaliar a existência de domínios transmembranares, de péptido-sinal e o grau de hidrofobicidade. Assim se deduziu que o polipéptido ORF1L114.pep possui três resíduos aminoacídicos de lisina nos sete primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal e ainda um resíduo de cisteína no sétimo resíduo aminoacídico após o hipotético péptido-sinal entre os aminoácidos 7 a 20. Já o outro possível péptido-sinal entre os resíduos aminoacídicos 14 a 27 não apresentou nas proximidades, a jusante, algum resíduo de cisteína. Portanto, a região da ORF1L114.pep entre os aminoácidos 7 a 20 apresenta maiores probabilidades de ser um péptido-sinal. A lipoproteína precursora, com a cisteína modificada, será posteriormente clivada por uma peptidase sinal, sendo a cisteína o primeiro aminoácido da proteína madura.

Existem indicações de que será provável que o polipéptido inferido ORF1L114.pep seja expresso em *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Essas indicações são a existência de um local provável de ligação ao ribossoma (RBS – *Ribosome Binding Site*), constituído por poli-G, a montante da ORF1L114, e a provável formação de um *hairpin* de terminação de transcrição a jusante da mesma ORF.

A ORF2R114.pep não apresentou nenhum resíduo de cisteína nas quatro regiões candidatas a péptido-sinal. É provável que a tradução desta ORF não se inicie na posição 4898, com o codão TTA para leucina, mas sim cerca de 20 nucleótidos adiante com o codão ATA para isoleucina ou GTG para valina, visto que ambos os codões são precedidos por uma zona boa candidata a RBS. Para além deste aspecto, a identificação de uma provável região promotora da transcrição, presente na repetição directa criada pela inserção de IS1634, leva a afirmar que a ORF2R114 é, com grande probabilidade, igualmente expressa. Este evento de transposição da sequência IS1634 não veio, portanto, impedir a expressão visto que a região promotora se manteve inalterada.

A reduzida dimensão do genoma dos micoplasmas faz com que a maior parte dos genes codifiquem, essencialmente, proteínas necessárias ao metabolismo basal e à estrutura da célula. As complexas exigências nutricionais e a fraca capacidade de adaptação e de resposta dos micoplasmas às condições ambientais são disso reflexo. Por isso, faz sentido que a maior parte das proteínas de membrana dos micoplasmas sejam análogas a típicas proteínas de membrana, envolvidas no transporte e metabolismo basal, de eubactérias. Devido também ao diminuto tamanho dos micoplasmas, a maior fracção do volume total ocupado pela célula corresponde à membrana celular. Isto sugere que a maior parte das diferentes proteínas celulares sejam proteínas de membrana. Estas proteínas têm também um papel importante devido ao nicho ecológico ocupado pelos micoplasmas, normalmente em associação com superfícies mucosas de hospedeiros eucariotas. Os micoplasmas têm, assim, que desenvolver, à superfície da membrana, mecanismos adequados para se protegerem dos sistemas de defesa dos hospedeiros. Estas deduções foram apoiadas ao analisar-se o genoma de *M. pneumoniae* que possui 46 lipoproteínas, número muito superior ao encontrado em *E. coli* e *Haemophilus influenza*.

Para além do aspecto relacionado com a patogenicidade, um outro factor determinou a escolha desta linha de investigação. Esse factor está subjacente a muito trabalho já realizado com *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, respeitante à tentativa de se encontrar um elemento genético que seja exclusivo deste organismo e possibilite, por isso, a sua identificação, diferenciando-o facilmente dos outros membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*" com os quais apresenta sobreposição de características fenotípicas. Até agora, a maior parte dos genes ou fragmentos de DNA de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC caracterizados existem também, com maior ou menor grau de homologia, noutros membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*" (Taylor *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1996; Frey *et al.*, 1998; Monnerat *et al.*, 1999; Vilei *et al.*, 2000). As únicas excepções dizem respeito à sequência de inserção IS1634 (Vilei *et al.*, 1999) e à lipoproteína LppQ (Abdo *et al.*, 2000), que parecem ser exclusivas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. A

sequência IS1634 é, portanto, um bom candidato para o desenvolvimento de sondas específicas ou de testes baseados em PCR, para detecção e identificação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, tendo já sido desenhados dois iniciadores para esse fim (Frey, comunicação pessoal). Por existir em elevado número de cópias (cerca de 30), o elemento IS1634 apresenta a vantagem de aumentar a sensibilidade do teste. A lipoproteína LppQ, por outro lado, poderá ser utilizada no desenvolvimento de testes de diagnóstico serológico e de vacinas, e o seu gene *lppQ* no desenvolvimento de iniciadores para testes de identificação do agente por PCR. Para que a informação relativa à análise da sequência de 5,6 kb possa ser utilizada para fins de identificação de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC e diagnóstico serológico (imunodetecção) ou molecular (PCR) da PPCB, interessa saber se alguma região desta sequência é específica deste micoplasma e se as proteínas putativas são imunogénicas. Como ponto de partida, a possibilidade de desenvolvimento de métodos de identificação baseados em PCR poderá ser feita, utilizando iniciadores derivados da sequência de 5,6 kb e analisando o resultado da amplificação do DNA de outras estirpes de micoplasmas de ruminantes, particularmente de membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*". A expressão, total ou parcial, em *E. coli* de qualquer das ORFs, após clonagem em vector apropriado, e a produção de anticorpos policlonais monospecíficos em coelho, permitirão avaliar, por testes de *immunoblotting*, a especificidade das potenciais proteínas em relação a *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e a sua utilidade para diagnóstico serológico da PPCB. Os eventuais polipéptidos inferidos da ORF1L114 e da região N-terminal da ORF2R114 são bons candidatos para este estudo, visto a análise computacional com os programas PEPWINDOW, TMAP e SIGCLEAVE ter revelado a existência de regiões hidrofóbicas, de domínios transmembranares e de péptido-sinal. No entanto, a análise dos aminoácidos no extremo N-terminal e nas proximidades dos putativos péptido-sinais, indicou que a ORF1L114.pep apresenta características que a tornam um bom candidato para expressão heteróloga e produção de antisoros monospecíficos. A sequência da ORF2R114 deverá ser completada, desenhando-se um iniciador que permita determinar a sequência nucleotídica da região contígua. Alguns genes codificantes de sub-grupos de lipoproteínas, as quais não possuem os sinais típicos que as caracterizam,

estão organizados em *tandem* de sete a 13 genes, como eventualmente poderá ser o caso das ORF1L114 e ORF2R114.

A abordagem da expressão de proteínas de micoplasma em *E. coli* e a produção de anticorpos hiperimunes em coelho foi posta em prática, com outra lipoproteína de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, tendo os resultados sido apresentados no Capítulo 3.

5



## 5- DIFERENCIAÇÃO DOS MEMBROS DO GRUPO “*MYCOPLASMA MYCOIDES*” ATRAVÉS DOS PERFIS DE RNA DE BAIXO PESO MOLECULAR

### 5.1 - INTRODUÇÃO

A diferenciação e identificação, pelos métodos convencionais, das sub-espécies pertencentes ao grupo “*Mycoplasma mycoides*” é difícil e morosa devido à sobreposição de características bioquímicas e serológicas. Por esta razão, têm sido desenvolvidos novos métodos de diagnóstico baseados na técnica de PCR com vista à detecção de regiões específicas do genoma. Alguns destes métodos baseiam-se na sequência do gene do RNA ribossómico (rRNA) 16S, também utilizada para estudos filogenéticos e taxonómicos.

A utilização dos perfis de RNAs estáveis de baixo peso molecular (*Low-Molecular-Weight* RNA, LMW-RNA) em taxonomia bacteriana foi proposta por Höfle em 1988 e tem vindo, desde então, a ser utilizada para a genotipagem de microrganismos procariontes (Höfle, 1990; Collins-Thompson *et al.*, 1991; Slade & Collins-Thompson, 1991; Bidle & Fletcher, 1995; Höfle & Brettar, 1996) e eucariontes (Velásquez *et al.*, 1998), em particular de espécies do género *Candida* (Santos *et al.*, 1994) e de outros géneros de leveduras (Velásquez *et al.*, 2000).

O método baseia-se na separação de LMW-RNA, que incluem o rRNA 5S e os RNAs de transferência (tRNAs), por electroforese em gel de poliacrilamida. A aplicação dos perfis de LMW-RNA para a identificação e a caracterização de membros da classe *Mollicutes* não foi referida até à presente data.

Nos micoplasmas, assim como noutros microrganismos, os tRNAs são pequenas moléculas de RNA (80–100 nucleótidos), estáveis, conservadas e estruturalmente complexas, universalmente utilizadas na descodificação da informação dos RNAs mensageiros (mRNAs) durante a síntese proteica. De acordo com o número de nucleótidos existentes no braço suplementar da molécula, a estrutura primária dos tRNAs compreende duas classes, classe 1 e



classe 2, com 1 a 5 nucleótidos e 6 a 20 nucleótidos, respectivamente (Clark, 1979). A estrutura secundária, em forma de trevo, observa-se em todas as moléculas de tRNA e deve-se à formação de pontes de hidrogénio (secundárias) entre nucleótidos (Holley *et al.*, 1965), resultando a característica conformação tri-dimensional em forma de L (Kim *et al.*, 1974), da formação de pontes de hidrogénio adicionais (terciárias) entre nucleótidos ainda não ligados. Em determinadas posições, os nucleótidos são conservados (existem sempre nessa posição em 90-95% dos tRNAs), enquanto noutras posições os nucleótidos são semi-conservados, i.e. são formados ou por bases púricas ou pirimidínicas. As pontes de hidrogénio secundárias e terciárias são formadas entre nucleótidos conservados e semi-conservados, o que explica a necessidade da sua conservação para manutenção das estruturas secundárias e terciárias comuns a todos os tRNAs.

Com excepção dos nucleótidos conservados em posições específicas, a sequência primária dos tRNAs varia tanto no número, como no tipo de modificação dos nucleósidos (Björk *et al.*, 1987). As diferenças no conteúdo de guaninas e de citosinas e na eventual presença de pares de bases não complementares (*non Watson-Crick*), influenciam a estabilidade da estrutura secundária (Sprinzl *et al.*, 1989). Para além deste aspecto, os codões utilizados, as sintetases de aminoacil-tRNA e outros factores de transcrição, evoluíram de forma distinta nas várias espécies optimizando a eficiência da síntese proteica. As populações de tRNAs também evoluíram em paralelo, de acordo com estas diferenças e de um modo específico para cada organismo.

Um aspecto curioso das moléculas de tRNA é, apesar da sua conservação em regiões específicas, a variabilidade observada nas estruturas primária e secundária. Com efeito, vários elementos da estrutura clássica de trevo podem desaparecer, desde que sejam preservadas as regiões do anticodão e do braço de ligação ao aminoácido. A região variável, nomeadamente os braços D e T, podem estar ausentes ou truncados sem que, aparentemente, ocorra perda da funcionalidade da molécula de tRNA (Dirheimer *et al.*, 1995).

Embora as implicações destas variações na conformação e na estabilidade dos tRNAs não sejam totalmente compreendidas, observa-se que, para além de cada organismo possuir uma população única de tRNAs, cada molécula

desta população apresenta uma estabilidade diferente quando comparada com a mesma molécula de um outro organismo.

A electroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução permite detectar, em condições optimizadas, pequenas diferenças nas sequências nucleotídicas e no padrão de modificação das bases, assim como avaliar a abundância dos tRNAs através do perfil de LMW-RNA obtido.

As primeiras análises de sequenciação de tRNA de micoplasmas foram realizadas no final da década de 70 e princípio da década de 80 (revisão por Samuelsson & Borén, 1992), utilizando estirpes de *M. mycoides* subsp. *capri* e de *M. capricolum* subsp. *capricolum*. Em relação a esta última subespécie, os estudos foram aprofundados, tendo sido clonados e sequenciados, tanto quanto se julga, todos os genes correspondentes às várias espécies de tRNAs (Muto *et al.*, 1990). Foram também isoladas e clonadas duas espécies de tRNA<sup>trp</sup> de *Spiroplasma citri* (Citti *et al.*, 1992).

Muto e colaboradores (1990) demonstraram a existência de 30 genes de 29 espécies de tRNAs em *M. capricolum* subsp. *capricolum*, enquanto que Chambaud *et al.* (2001) sequenciaram 29 genes de tRNA, sendo, entre todos os sistemas genéticos conhecidos à excepção da mitocôndria, os que possuem o menor número de tRNAs conhecido. Com efeito, a grande maioria dos organismos possui, pelo menos, 45 a 50 espécies distintas de tRNAs. São exemplo os 78 genes de 45 tRNAs e os 51 genes de 31 tRNAs identificados, respectivamente, nos genomas de *E. coli* e de *Bacillus subtilis* (revisto por Dirheimer *et al.*, 1995).

No genoma de *M. capricolum* subsp. *capricolum*, 22 genes de tRNAs estão organizados em três grupos de, respectivamente, nove, cinco e quatro genes e dois grupos de dois genes cada, enquanto que os restantes oito genes existem numa única unidade transcricional. À excepção de dois genes de tRNA(Lys), os restantes tRNAs são codificados por um único gene (Muto *et al.*, 1990). A organização dos genes de tRNA em grupos é muito semelhante à organização dos grupos de 21 e 16 genes de tRNA em *Bacillus subtilis*, sugerindo que os genes de tRNA dos micoplasmas tenham evoluído a partir de grandes grupos de genes de tRNAs existentes no genoma de bactérias Gram-positivas ancestrais, por eliminação de genes redundantes.

Para além do rRNA 5S e dos tRNAs, que constituem os LMW-RNA, foram isolados seis pequenos RNAs estáveis em *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Ushita & Muto, 1993). As sequências destes RNAs, designados por MCS1 a MCS6, foram determinadas por sequenciação parcial das moléculas e dos respectivos genes. MCS2 e MCS3 contêm, respectivamente, 92 e 105 nucleótidos (Ushita & Muto, 1995) e não possuem semelhança com outro RNA estável até agora conhecido, enquanto que os restantes MCS possuem similaridade elevada com sequências conhecidas. Assim, MCS1, MCS5 e MCS6 são homólogos de, respectivamente, RNA 4,5 S de *E. coli*, RNA 10as e RNA M1 (Rnase P RNA). O RNA MCS4, com 125 nucleótidos, revelou similaridade com a sequência do snRNAs (*small nuclear RNA*) U6 dos eucariontes (Ushita & Muto, 1993), embora a sua função seja até agora desconhecida (Ushita *et al.*, 1997).

\*\*\*

O objectivo do estudo a seguir apresentado foi:

- i) Avaliar se os perfis de tRNA de membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*" permitem a sua diferenciação e caracterização;
- ii) Analisar as variações dos perfis de LMW-RNA de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC isoladas de diferentes hospedeiros e órgãos.

## 5.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Para desenvolver este novo método de genotipagem de micoplasmas, foram utilizadas as estirpes tipo dos seis membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*" e 31 estirpes de campo de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Tabela 5.1), incluindo 10 de origem africana.

Foram testados diferentes protocolos de extracção de RNA e de condições de electroforese em gel de poliacrilamida.

Para eliminar a actividade das ribonucleases (RNase), o material de vidro, o equipamento de electroforese, a água *MilliQ* (Millipore) e as soluções utilizadas foram previamente tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC), de acordo com o descrito por Sambrook *et al.* (1989).

### 5.2.1-Extracção de RNA de baixo peso molecular (LMW-RNA)

O RNA de baixo peso molecular foi extraído utilizando uma adaptação do método de fenol-SDS (Höfle 1988), a partir de 100 ml (grande escala) ou de 10 ml (pequena escala) de uma cultura de micoplasmas com DO<sub>540</sub> entre 0,5 e 0,7 em meio Hayflick. As células foram recuperadas por centrifugação durante 15 min a 12000 g, a 4°C, e os sedimentos mantidos a -70°C durante pelo menos 24 h, após lavagem com 50 ml (grande escala) ou 5 ml (pequena escala) de água estéril desionizada.

Às bactérias congeladas foi adicionado um volume (10 x o volume de células: 10 ml para grande escala ou 750 µl para a pequena escala) de mistura de extracção (50 mM acetato de sódio, 10 mM EDTA, pH 4,5, 1% p/v SDS), e agitou-se. Adicionou-se igual volume de fenol equilibrado com tampão citrato 0,1 M pH 4,5 (Sigma P4682) aquecido a 60°C e, após agitação vigorosa, incubou-se a mistura a 60°C durante 10 min. Parou-se a reacção por incubação em gelo durante, pelo menos, 2 min. Separou-se a fase fenólica da fase aquosa por centrifugação a 10000 g, durante 5 min a 2°C. Transferiu-se a fase superior aquosa para um tubo com igual volume de mistura de fenol e clorofórmio (4:1 v/v), aquecida a 60°C, e incubou-se a 60°C durante 5 min. Parou-se esta segunda extracção incubando em gelo e centrifugando como acima descrito. Colocou-se o sobrenadante num novo tubo e adicionou-se 1/10 do volume de 2 M acetato de sódio e clorofórmio em volume igual ao sobrenadante. Agitou-se e centrifugou-se, como anteriormente, para separação das fases.

Para eliminar vestígios de fenol, adicionou-se clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), em volume igual ao do sobrenadante, agitou-se e centrifugou-se.

O RNA de baixo peso molecular (LMW-RNA) foi precipitado a -20°C durante a noite, adicionando ao sobrenadante 2,5 volumes de mistura de

precipitação (etanol absoluto, 2M acetato de sódio, 1 M cloreto de magnésio, numa razão de 100:10:1 v/v).

O RNA foi conservado a -20°C nesta mistura de precipitação de etanol. A concentração das amostras em RNA de baixo peso molecular foi determinada a partir de uma alíquota que foi centrifugada e ressuspensa em água, assumindo que  $A_{260} = 1$  corresponde a 40 µg/ml de RNA.

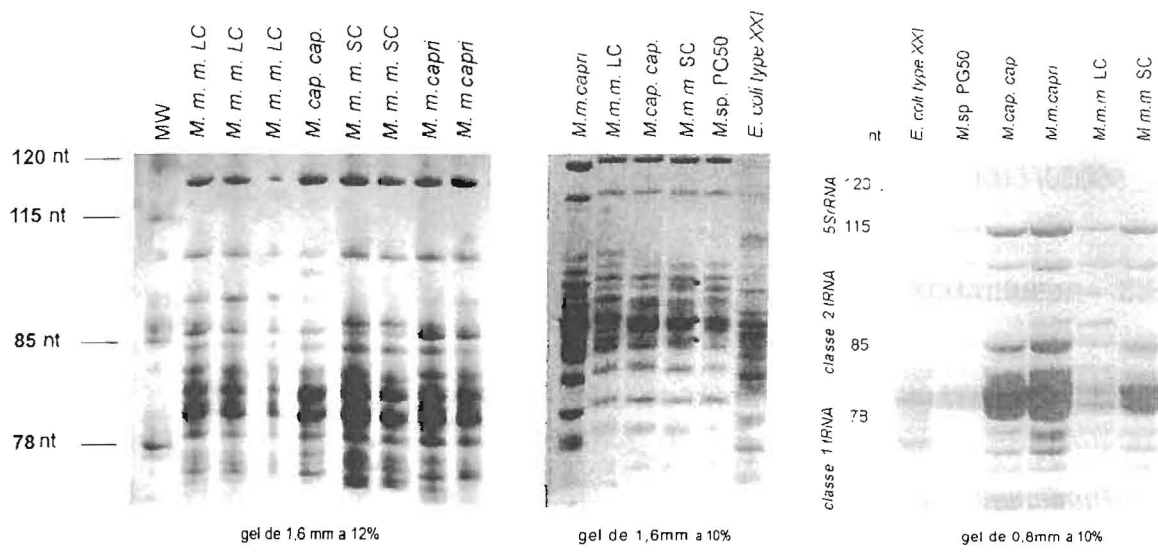
Imediatamente antes da electroforese um volume de precipitado em etanol, correspondente a 30 a 50 µg de tRNA, foi centrifugado a 12000 g, durante 10 min a 2°C e o sedimento, após secagem ao ar, ressuspensa em 10 a 20 µl de água DEPC e 4 µl de tampão de aplicação da amostra (10 mM acetato de sódio pH 4,5, 2,5 mM EDTA, 8 M ureia, 60% p/v sacarose, 0,1% p/v azul de bromofenol, 0,1% p/v xileno cianole).

Na extracção em pequena escala, o RNA do precipitado em etanol foi ressuspensa em 10 a 20 µl de formamida a 100% v/v (Pharmacia 17-1320-01) a 4°C e a sua concentração determinada por leitura da absorvência a 260 nm. Utilizou-se 10 a 15 µg (1 µg/µl) deste RNA para a electroforese.

Quando se verificou contaminação com fenol e/ou proteína, através de uma razão  $A_{260}/A_{280}$  inferior a 1,7 ou superior a 2,0, a amostra foi novamente purificada. Esta purificação e enriquecimento da amostra na fracção de RNA de baixo peso molecular foi feita a partir do precipitado em etanol, usando o sistema Tip-20 RNA mini composto por colunas de troca iónica, de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN). Neste caso, o RNA de baixo peso molecular foi precipitado por adição de álcool isopropílico gelado e ressuspensa em 100 µl de água isenta de RNases (água tratada com DEPC). Na electroforese utilizou-se 30 a 50 µg (2,5 µg/µl) de amostra.

O procedimento para extracção de LMW-RNA encontra-se esquematizado na Figura 5.1

representam os tRNAs mais abundantes que descodificam os codões mais comuns. As restantes espécies de tRNA ou co-migram com as mais abundantes ou não são detectáveis.

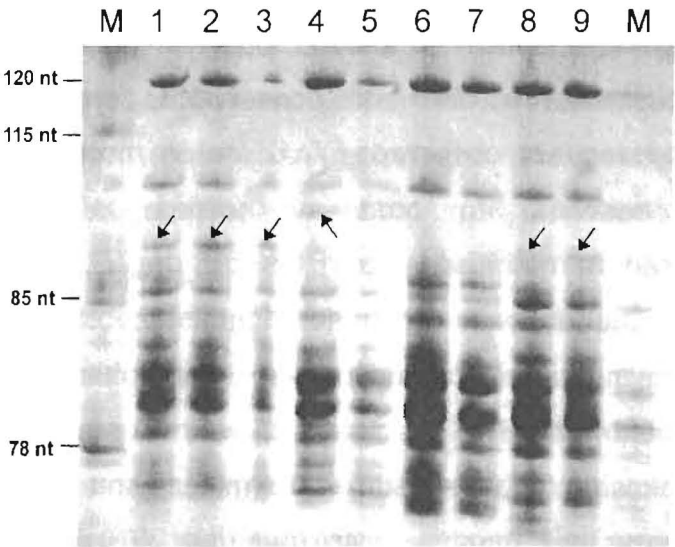


**Figura 5.2-** Separação de LMW-RNA por electroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 12% com diferentes espessuras, em condições de diferença de potencial constante. Abreviaturas: *M.m.m.*- *M. mycoides* subsp. *mycoides*; *M.cap.cap.*- *M. capricolum* subsp. *capricolum*; *M.m.capri*- *M. mycoides* subsp. *capri*; *M. sp. PG50*- *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino estirpe PG50; MW- marcador de pesos moleculares.

A reprodutibilidade do método electroforético para análise dos perfis de tRNA e a consistência dos perfis obtidos foram avaliados testando, para cada estirpe, várias alíquotas da mesma amostra de tRNA em diferentes corridas electroforéticas, em diferentes dias e nas mesmas condições (resultados não apresentados). Para além disso, amostras de LMW-RNA da mesma estirpe, preparadas independentemente, foram também analisadas no mesmo gel (Figura 5.3) e em géis com diferentes características de concentração e espessura (Figura 5.2).

Nas condições electroforéticas em que se aplicou uma diferença de potencial constante, o rRNA 5S foi separado em duas bandas, os tRNA da classe 2 (83-96 nt) em três a quatro bandas, e os tRNA da classe 1 (72-79 nt),

os mais abundantes, em várias bandas, apresentando as mais pequenas menor resolução e uma aparência mais difusa (Figura 5.2).



**Figura 5.3-** Separação de LMW-RNA por electroforese em gel de poliacrilamida a 12% sujeito a diferença de potencial constante. Pistas 1, 2 e 3: *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC; Pista 4: *M. capricolum* subsp. *capricolum*; Pistas 5, 6 e 7: *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC; Pistas 8 e 9: *M. mycoides* subsp. *capri*; M- marcador de pesos moleculares (ver 5.2.2). As setas indicam bandas correspondentes a moléculas de tRNA que distinguem as diferentes subespécies.

O rRNA 5S das estirpes de *Mycoplasma* analisadas apresentou uma mobilidade electroforética distinta, quando comparada com a mobilidade do rRNA 5S das estirpes *E.coli* W type XXI e MRE 600. Para cada uma das estirpes testada era esperada apenas uma banda correspondente ao rRNA 5S, mas para todas elas foram observadas, sempre na mesma posição, duas bandas.

A espessura do gel não teve influência notória na resolução das bandas, mas verificou-se que o gel com 1,6 mm de espessura era mais fácil de manipular durante os passos de coloração/descoloração. O gel de poliacrilamida a 12% (Figura 5.3) apresentou uma melhor separação de bandas aliada a uma significativa redução do tempo de electroforese (45 h em vez de 65 h).

C) Diferença de potencial crescente (*StairCase Electrophoresis* - SCE), iniciando-se a electroforese a 100 V e continuando com incrementos de 50 V em cada 10 min até se atingir 2000 V (cerca de 6 h), de acordo com Cruz-Sánchez *et al.* (1997).

Após a electroforese, os géis foram corados durante 60 min em 1% p/v azul de metileno e 100 mM acetato de sódio, pH 4,5 e descorados com água corrente. Os géis foram fotografados utilizando o equipamento *UVP Imagestore 5000/7500*.

## 5.3 – RESULTADOS

### 5.3.1 – Preparação e separação de LMW-RNA

#### *Purificação de RNA*

Foram obtidas concentrações elevadas de RNA (entre 10 e 30 µg/ml) na preparação em larga escala, que se verificou ser o método mais adequado quando comparado com a extracção em pequena escala. A resolução e separação das bandas de tRNA no gel de poliacrilamida é melhorada com o aumento de concentração das amostras. O procedimento descrito demora cerca de 4 a 5 h, mas permite obter amostras puras de RNA de baixo peso molecular. A utilização do sistema de purificação em coluna com *Tip-20 RNA mini* (QIAGEN) pode melhorar a qualidade do tRNA extraído, mas apenas em alguns casos se verificou ser necessário recorrer à sua utilização.

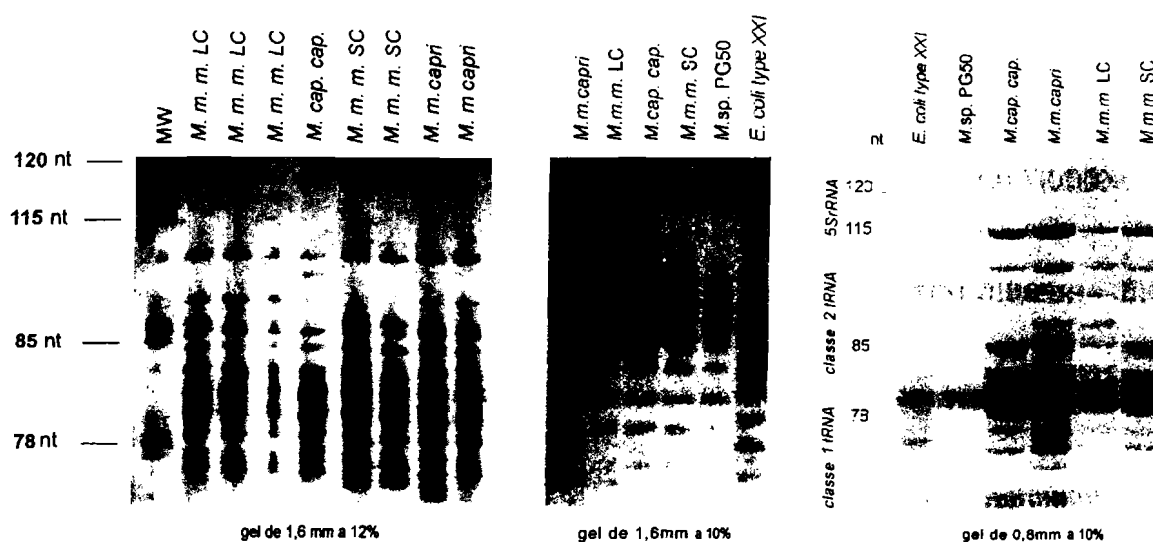
Também o tratamento com DEPC é prescindível, visto que os RNAs de baixo peso molecular, e particularmente os tRNA, não são tão susceptíveis à degradação como os mRNA. De facto, não se observaram diferenças significativas quando se omitiu o tratamento com DEPC.

#### *Electroforese de tRNA em gel de poliacrilamida: condições A*

De entre as 26-29 moléculas diferentes de tRNA, referidas para os micoplasmas, apenas 12 a 15 (Figuras 5.2 e 5.3) foram detectadas nos géis de poliacrilamida a 10 e 12% nas condições electroforéticas de diferença de potencial constante a 350 V e a 4°C (condições A). Estas moléculas



representam os tRNAs mais abundantes que descodificam os codões mais comuns. As restantes espécies de tRNA ou co-migram com as mais abundantes ou não são detectáveis.

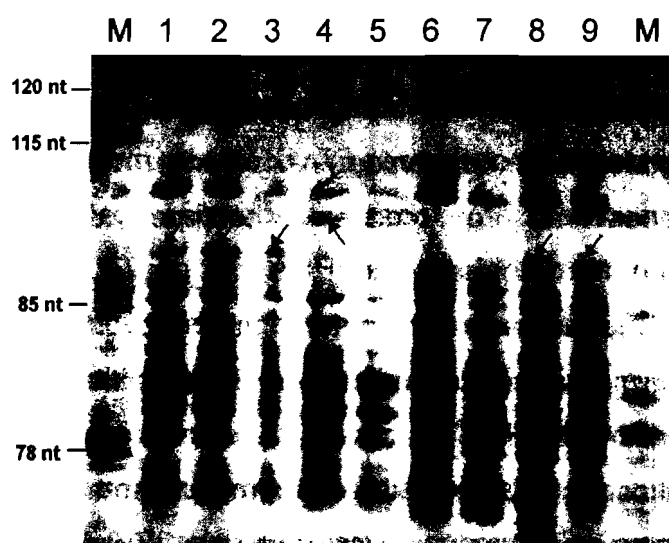


**Figura 5.2-** Separação de LMW-RNA por electroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 12% com diferentes espessuras, em condições de diferença de potencial constante. Abreviaturas: *M.m.m.*- *M. mycoides* subsp. *mycoides*; *M.cap.cap.*- *M. capricolum* subsp. *capricolum*; *M.m.capri*- *M. mycoides* subsp. *capri*; *M. sp. PG50*- *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino estirpe PG50; MW- marcador de pesos moleculares.

A reprodutibilidade do método electroforético para análise dos perfis de tRNA e a consistência dos perfis obtidos foram avaliados testando, para cada estirpe, várias alíquotas da mesma amostra de tRNA em diferentes corridas electroforéticas, em diferentes dias e nas mesmas condições (resultados não apresentados). Para além disso, amostras de LMW-RNA da mesma estirpe, preparadas independentemente, foram também analisadas no mesmo gel (Figura 5.3) e em géis com diferentes características de concentração e espessura (Figura 5.2).

Nas condições electroforéticas em que se aplicou uma diferença de potencial constante, o rRNA 5S foi separado em duas bandas, os tRNA da classe 2 (83-96 nt) em três a quatro bandas, e os tRNA da classe 1 (72-79 nt),

os mais abundantes, em várias bandas, apresentando as mais pequenas menor resolução e uma aparência mais difusa (Figura 5.2).



**Figura 5.3-** Separação de LMW-RNA por electroforese em gel de poliacrilamida a 12% sujeito a diferença de potencial constante. Pistas 1, 2 e 3: *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC; Pista 4: *M. capricolum* subsp. *capricolum*; Pistas 5, 6 e 7: *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC; Pistas 8 e 9: *M. mycoides* subsp. *capri.*; M-marcador de pesos moleculares (ver 5.2.2). As setas indicam bandas correspondentes a moléculas de tRNA que distinguem as diferentes subespécies.

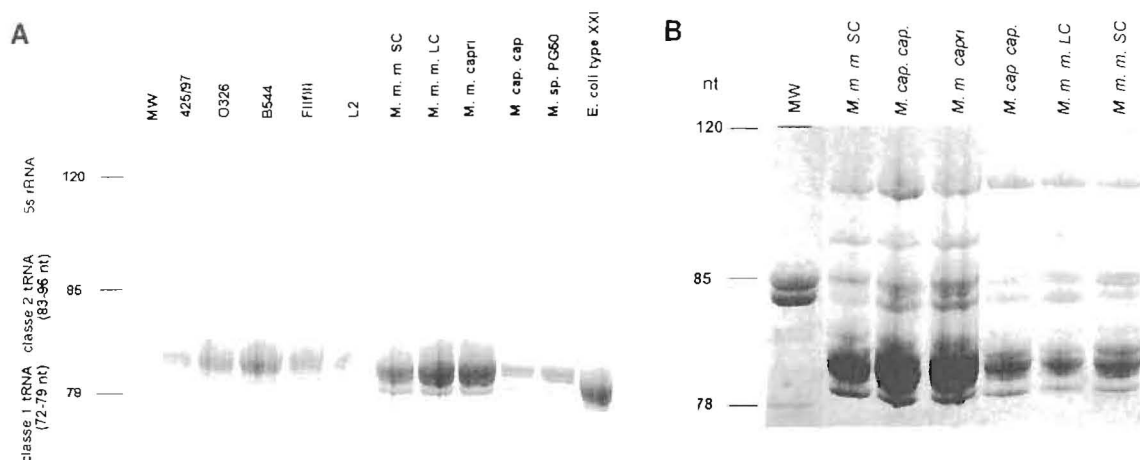
O rRNA 5S das estirpes de *Mycoplasma* analisadas apresentou uma mobilidade electroforética distinta, quando comparada com a mobilidade do rRNA 5S das estirpes *E.coli* W type XXI e MRE 600. Para cada uma das estirpes testada era esperada apenas uma banda correspondente ao rRNA 5S, mas para todas elas foram observadas, sempre na mesma posição, duas bandas.

A espessura do gel não teve influência notória na resolução das bandas, mas verificou-se que o gel com 1,6 mm de espessura era mais fácil de manipular durante os passos de coloração/descoloração. O gel de poliacrilamida a 12% (Figura 5.3) apresentou uma melhor separação de bandas aliada a uma significativa redução do tempo de electroforese (45 h em vez de 65 h).

*Electroforese de tRNA em gel de poliacrilamida: condições B e C.*

Nas condições electroforéticas a potência constante (condições **B**) obteve-se sempre o mesmo padrão geral, em gel a 12% com 0,4 mm de espessura, sendo observados três grupos de LMW-RNA (Figura 5.4): rRNA 5S, tRNA da classe 2 e tRNA da classe 1. Contudo, os perfis de LMW-RNA das diferentes estirpes apresentaram-se altamente conservados, sem que qualquer distinção entre eles pudesse ser observada. A diferente mobilidade do rRNA 5S foi novamente observada em todas as estirpes de micoplasmas, quando comparada com a mobilidade do rRNA 5S de *E. coli*, mas sem que se visualizasse a banda extra de menor dimensão, observada nas condições electroforéticas anteriores (condições **A**). Foram observadas três bandas na zona de migração dos tRNA da classe 2, sendo o seu número, abundância e posição idênticos em todas as estirpes de micoplasma estudadas. Nesta classe seria de esperar seis bandas, visto que das 29 espécies de tRNA de *M. capricolum* subsp. *capricolum* três correspondem à leucina, duas à serina e uma à tirosina, os três aminoácidos cujos tRNAs pertencem à classe 2 em procariontes (Clark, 1979). A zona de migração da classe 1 apresentou baixa resolução, confirmando-se, no entanto, que esta classe é a mais abundante.

Resultados semelhantes foram obtidos em gel de poliacrilamida a 12% com 0,4 mm de espessura, nas condições electroforéticas a diferença de potencial crescente (condições **C**), sem melhoria da resolução (Figura 5.4- B).

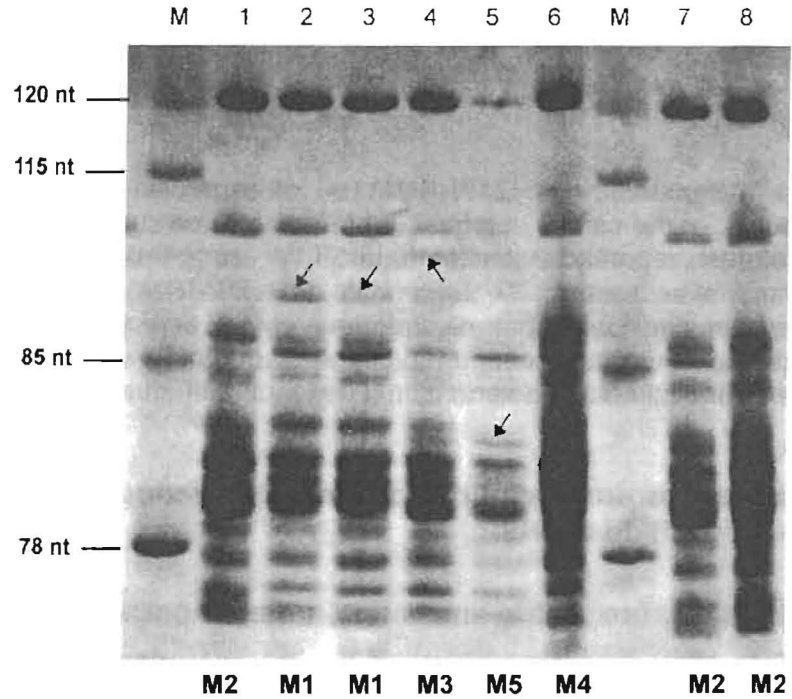


**Figura 5.4- A-** Separação de LMW-RNA de subespécies do grupo “*Mycoplasma mycoides*” e de várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, por electroforese a potência constante de 60 W, em gel de poliácridamida a 12% e 0,4 mm de espessura; **B-** Separação de LMW-RNA de membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*” por electroforese em gel de poliácridamida a 12% e 0,4 mm de espessura, aplicando uma diferença de potencial crescente, durante 6 h 30 min. Abreviaturas de acordo com a legenda da Figura 5.2.

### 5.3.2- Caracterização dos membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*” por análise do perfil de tRNAs

Com base nos resultados anteriores, o gel de poliácridamida a 12% e 1,6 mm de espessura foi eleito para separação de LMW-RNA nas condições electroforéticas de diferença de potencial constante (condições **A**). Foi com a separação das duas classes de tRNA por este método (Botelho *et al.*, 2001) que se obteve a diferenciação das seis espécies e subespécies dos membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*” em cinco tipos de perfis de tRNA (Figura 5.5 e Tabela 5.1). Na subespécie *M. mycoides* subsp. *mycoides*, a distinção entre os biótipos SC e LC foi evidente (perfis M2 and M1, respectivamente). A subespécie *M. mycoides* subsp. *capri* apresentou um perfil de tRNA (perfil M1) semelhante ao de *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, mas distinto do perfil dos outros membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*”. Cada uma das estirpes tipo das outras espécies e subespécies: *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumonia* e *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino, apresentou um perfil específico designado, respectivamente, por M3, M4 e M5. Contudo, em resultados preliminares pudemos observar que a diferença entre

os perfis de *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino não foi tão evidente (Botelho *et al.*, 2000), o que veio provar que a uniformização das condições electroforéticas é factor essencial para obter resultados consistentes e comparáveis.



**Figura 5.5-** Análise dos perfis de tRNA dos seis membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*”. As setas indicam polimorfismos apresentados pelas diferentes subespécies, com realce para a banda extra com uma dimensão entre 85 e 115 nucleótidos apresentada apenas por ambas as subespécies *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subsp. *capri*. Pista 1: *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC; Pista 2: *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC; Pista 3: *M. mycoides* subsp. *capri*; Pista 4: *M. capricolum* subsp. *capricolum*; Pista 5: *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino; Pista 6: *M. capricolum* subsp. *capripneumonia*; Pistas 7 e 8: Estirpes *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC C305 e O326. M- marcador de pesos moleculares. As setas indicam as bandas referentes a moléculas de tRNA específicas de cada subespécie. Na base da figura indicam-se os diferentes perfis de tRNA

**Tabela 5.1-** Perfil electroforético de tRNA para os diferentes membros do grupo “*Mycoplasma mycoides* ” e para estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC utilizados neste estudo

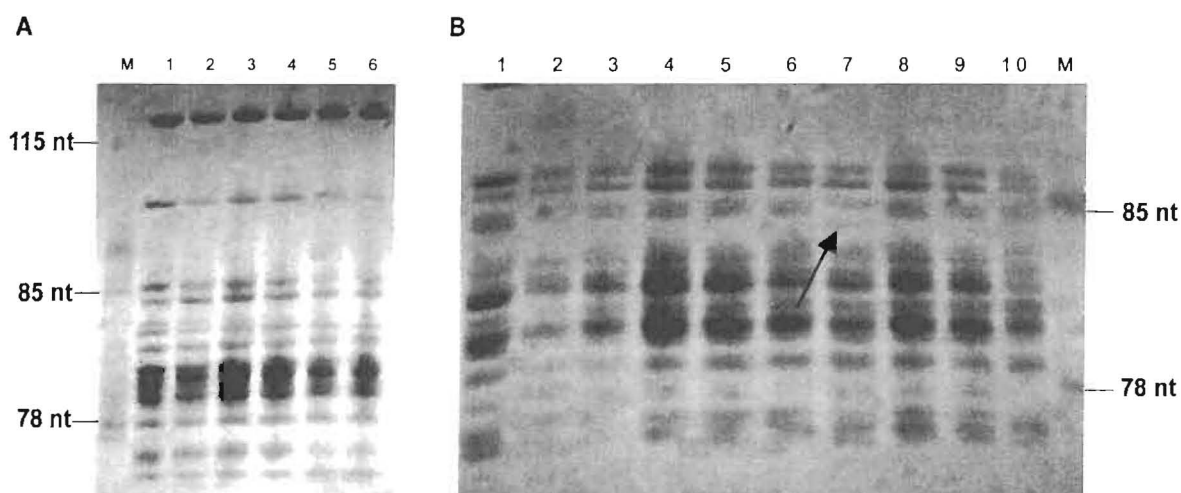
Micoplasma	Estirpe	Origem	Hospedeiro/órgão de isolamento	Tipo de perfil de tRNA
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3 <sup>T</sup>	Turquia	Caprino	M1
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	Y-Goat <sup>T</sup>	Austrália	Caprino	M1
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	PG1 <sup>T</sup>	---	Bovino	M2
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California kid <sup>T</sup>	E.U.A.	Caprino	M3
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumonia</i>	F38 <sup>T</sup>	Quênia	Caprino	M4
<i>Mycoplasma</i> sp. grupo 7 bovino	PG50 <sup>T</sup>	Austrália	Bovino	M5
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	C305	Portugal	Caprino/pulmão	M2
	O326	Portugal	Ovino/leite	M2
	L2	Itália	Bovino/pulmão	M2
	B773/125	Portugal	Bovino/semem	M2
	B820/123	Portugal	Bovino/lavagens perpucciais	M2/1
	6092/97	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	425/97	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	B674/93	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	B675/93	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	2887/96	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	4366/97	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	2881/96	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	2886/96	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	4299/97	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	1674/98	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	268/95	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	816/98	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	425/97	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	1670/98	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	1672/98	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	B676P/93	Portugal	Bovino/pulmão	M2
	Filfili	Senegal	Bovino	M2
	Gemu Gofa	Etiópia	Bovino	M2
	T1Sr	Tanzânia	Bovino/estirpe vacinal	M2
	2162	Senegal	Bovino	M2
	9411 I	Ruanda	Bovino	M2
	KH3J	Sudão	Bovino/estirpe vacinal	M2
	87137-9	Burkina Faso	Bovino	M2
	Fatick	Senegal	Bovino	M2
	Dakar 2144	Senegal	Bovino	M2
	T1/44	Tanzânia	Bovino/estirpe vacinal	M2

<sup>T</sup> Estirpe Tipo

### 5.3.3- Variação intraspecífica dos perfis de tRNA

A análise dos perfis de tRNA de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC foi feita nas mesmas condições electroforéticas usadas para analisar os perfis de tRNA dos membros do grupo “*Mycoplasma mycoides*”.

A maioria das estirpes apresentou o perfil M2 da estirpe tipo PG1 (Figura 5.6), com excepção da estirpe B820/123 que, de um modo consistente, apresentou um polimorfismo na posição de uma banda (Botelho *et al.*, 2000).



**Figura 5.6- A e B** – Dois aspectos da separação de LMW-RNA de várias estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, por electroforese em gel de poliácridamida a 12%, a 350 V e 4 °C. **A**- Pista 1- estirpe PG1; Pistas 2 a 6- estirpes africanas: 2- Filfil; 3- Gemu Gofa; 4- T1-44; 5- T1-Sr; 6- 2162. **B**- Pista 1- estirpe PG1; Pistas 2 a 10- estirpes europeias: 2- L2; 3- 1674/98; 4- 268/95; 5- 816/98; 6- 425/97; 7- B820/123; 8- B773/125; 9- 1670/98; 10- 1672/98. M- marcador de peso molecular. A micro-heterogeneidade verificada na estirpe B820/123 (perfil M2/1 – pista 7) encontra-se assinalada por uma seta.

## 5.4 – DISCUSSÃO

O número de espécies de tRNA em procariontes é relativamente baixo (40-60 tRNAs), o que facilita a interpretação dos perfis de tRNA. Uma vez que os micoplasmas têm apenas 26-29 espécies de tRNA, esta facilidade é supostamente acrescida. No entanto, para que tal seja possível, as condições electroforéticas devem ser optimizadas de modo a que a estrutura secundária dos tRNA não seja completamente desnaturada. É necessário que a migração

das moléculas de tRNA no gel seja, portanto, influenciada pela estrutura secundária residual. As moléculas de tRNA com diferentes sequências possuem, nas suas hélices duplas em forma de ansa, diferenças no conteúdo em G+C e em pares de bases que não emparelham de acordo com o modelo Watson-Crick. Assim, as suas estruturas secundárias serão mais ou menos facilmente desnaturadas e, por conseguinte, migrarão diferentemente através da malha do gel.

A electroforese em condições de diferença de potencial constante a 350 V, 4°C, satisfaz estes requisitos e provou ser a de maior poder de resolução (Botelho *et al.*, 2000), quando comparada com as electroforeses em condições de potência constante ou diferença de potencial crescente. A análise dos perfis de LMW-RNA de micoplasmas usando as condições mais adequadas possibilitou a separação das seis estirpes tipo dos membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*" por cinco perfis de tRNA distintos. O perfil de tRNA obtido para cada estirpe foi reprodutível, a avaliar pelos resultados da análise da mesma amostra em diferentes géis e da análise de amostras da mesma estirpe preparadas independentemente e corridas no mesmo gel ou em diferentes géis.

Uma outra técnica para análise comparativa de RNAs bacterianos de baixo peso molecular (entre 70 e 135 nucleótidos) foi desenvolvida e testada por Katsivela e Höfle (1995), mas só foi obtida boa resolução com tRNAs de dimensão até 79 nucleótidos.

Pela análise dos perfis de tRNA, nas condições electroforéticas empregues, conseguiu-se diferenciar, claramente, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC de *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC. Esta técnica provou, assim, ser extremamente útil como complemento ou alternativa aos métodos convencionais para a identificação e caracterização de novos isolados e para diagnóstico de doenças causadas por membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*". Verificou-se haver uma variação, reprodutível e significativa, tanto ao nível da espécie como da subespécie nos perfis de tRNA obtidos.

A análise dos perfis de tRNA parece pois apropriada para a caracterização de espécies. Esta observação foi reforçada pela análise dos perfis de tRNA de



duas estirpes de *Mycoplasma bovis* que evidenciaram um padrão característico e específico (resultados não apresentados). A única exceção foi a da estirpe B820/123 de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC isolada de lavagens perpucciais, a qual apresentou uma micro-heterogeneidade quando comparada com a estirpe tipo PG1 e com 30 estirpes de campo. Esta exceção não invalida, no entanto, a utilidade desta abordagem para a genotipificação de espécies. Foi anteriormente demonstrado, por análise de *immunoblotting* com soros de bovinos portugueses e africanos reactivos à PPCB e com três soros hiperimunes de coelho contra *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, que a estirpe B820/123 nunca apresentou o antígeno p95. Este antígeno foi considerado um dos cinco antígenos imunodominantes que reagem com anticorpos anti-*M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e que contribuem para o perfil considerado imunoespecífico desta doença (Gonçalves *et al.*, 1998). Uma outra estirpe (B820/124), também isolada de lavagens perpucciais, apresentou o padrão de *immunoblotting* típico das estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Gonçalves *et al.*, 1998). A particularidade da estirpe B820/123, tanto no perfil de LMW-RNA como no perfil de *immunoblotting*, não pode, portanto, ser explicada por uma especificidade relacionada com o seu nicho ecológico.

A distinta mobilidade electroforética apresentada pelo rRNA 5S dos micoplasmas analisados, quando comparada com a mobilidade do rRNA 5S das estirpes *E. coli* W type XXI e MRE 600, está de acordo com a dimensão conhecida deste rRNA, que varia entre 104 a 113 bases nos membros da classe *Mollicutes*, sendo em *M. capricolum* subsp. *capricolum* de 107 bases (Hori *et al.*, 1981). Esta dimensão é inferior à dimensão do rRNA 5S de *Bacillus subtilis* (116 bases) e à de *E. coli* (120 bases). A observação de duas bandas na zona de migração do rRNA 5S, sempre na mesma posição para todas as estirpes, também foi referida para outros grupos microbianos (Höfle, 1988; Velázquez *et al.*, 1998). No entanto, ao contrário dos membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*", para diferentes espécies foram encontradas diferenças quer no número quer na posição das bandas. É provável que os pequenos RNAs estáveis MCS2 e MCS3 (Ushita & Muto, 1995), embora existindo em concentração baixa, possam também contribuir para a formação das bandas observadas.

Cada perfil de tRNA é formado por um número relativamente pequeno (10 a 15) de bandas principais de tRNA electroforeticamente separáveis, que podem ser facilmente discriminadas a olho nu. Utilizando como padrões electroforéticos amostras de tRNA preparadas a partir de estirpes tipo, é relativamente acessível a identificação visual de espécies desconhecidas, com base no seu perfil de tRNA, desde que os padrões e as estirpes desconhecidas sejam comparadas no mesmo gel. No entanto, a utilização de métodos computacionais para construção de bases dos perfis obtidos e sua posterior análise, tanto dos padrões como da intensidade de bandas de tRNA, permitirá comparar e relacionar mais facilmente novos perfis com os perfis padrão conhecidos.

Os resultados obtidos com os perfis de tRNA estão de acordo com os resultados de estudos filogenéticos dos membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*", baseados na análise das sequências do gene de rRNA 16S (Pettersson *et al.*, 1996) e do gene de uma proteína de membrana putativa (Thiaucourt *et al.*, 2000). O primeiro estudo revelou uma similaridade de 99,9% entre *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e uma relação próxima entre a estirpe PG50 de *Mycoplasma* sp. grupo 7 bovino e *M. capricolum* subsp. *capricolum*. Segundo o mesmo estudo, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC pertence, isolado, a um ramo intermédio distinto. A proposta de reclassificação das subespécies *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subsp. *capri*, incluindo-se as duas subespécies numa única – *M. mycoides* subsp. *capri* - foi também aqui reforçada com os dados apresentados, baseados nos perfis de tRNA.

6



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção de mais informação a nível molecular que permitisse a identificação, rápida e segura, de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, a distinção entre estirpes e o esclarecimento de mecanismos de patogenicidade, constituíram os objectivos primordiais deste trabalho, tentando contribuir, assim, para melhorar o diagnóstico e o controlo da PPCB. É nesse contexto que a seguir salientamos alguma dessa informação obtida no decurso desta investigação.

- A tipificação de estirpes com o elemento de inserção IS1296 revelou uma grande homogeneidade relativamente ao padrão de hibridação das 105 estirpes portuguesas (padrão E1), isoladas de surtos de PPCB em Portugal entre 1993 e 1998. Não se detectou nenhuma estirpe com padrão característico do grupo africano, sugerindo que os surtos de PPCB tiveram todos a mesma origem, tal como os surtos ocorridos noutros Países europeus. Esta abordagem não se revelou, portanto, adequada ao estudo epidemiológico e identificação de focos de infecção em surtos de PPCB que possam ter ocorrido num curto período de tempo e numa região bem delimitada. Em contrapartida, confirmando estudos anteriores de outros autores, o mesmo método aplicado ao estudo da evolução da doença ao longo de 50 anos em diversos países de três continentes permitiu distinguir o grupo de estirpes europeu do grupo africano/australiano e sugerir a origem do ressurgimento de surtos na Europa nos anos 80. As duas estirpes portuguesas que apresentaram perfis diferentes (E2 e E3) derivados, provavelmente, do padrão mais comum europeu E1, devido à adição de uma cópia de IS1296 (estirpe B676P/93) e à excisão de uma cópia de IS1296 (estirpe 6092), deverão ser futuramente estudadas mais em detalhe. Este estudo deverá incidir, nomeadamente, sobre características fenotípicas tais como morfologia, taxa de crescimento, utilização de diferentes substratos, perfil proteico, capacidade imunogénica e capacidade de multiplicação *in vivo*, de modo a

esclarecer-se se a alteração genética acarretou modificação de alguma propriedade que possa, eventualmente, estar relacionada com a patogenicidade.

- A comparação da região do genoma em que se localizam os elementos de inserção, tanto nas estirpes europeias como nas estirpes africanas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, serviu de base ao desenvolvimento de um sistema de PCR usando os iniciadores 7500BP1L e 3480BPR. Estes iniciadores, complementares de uma região adjacente a um fragmento de 8,5 kb que se verificou apenas existir nas estirpes africanas, permitiram não só identificar a subespécie *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, distinguindo-a das outras espécies e subespécies do grupo "*Mycoplasma mycoides*", mas também detectar a origem da estirpe relativamente aos continentes Europeu ou Africano, por amplificação de um fragmento de 450 pb do genoma apenas das estirpes europeias. Este método baseado em PCR provou, assim, ser específico ao nível da estirpe. Nas estirpes africanas amplificou-se um fragmento de 9,3 kb com os mesmos iniciadores. Houve, no entanto, que proceder a uma adaptação do método a condições que permitem a amplificação de fragmentos longos, sendo este PCR apenas utilizado naqueles casos em que o PCR específico das estirpes europeias seja negativo.
- A expressão em *E. coli* de parte do gene *lppB*, existente no fragmento de 8,5 kb presente nas estirpes africanas e que codifica uma lipoproteína de membrana putativa, permitiu também distinguir soros de bovinos infectados com estirpes europeias de bovinos infectados com estirpes africanas, com base no perfil de *immunoblotting*. Nestes ensaios, esta proteína recombinante foi reconhecida apenas por soros de animais infectados com a estirpe africana Afadé ou com soros hiperimunes de coelho anti-LppB. A proteína LppB é efectivamente específica de estirpes africanas, visto que apenas no perfil proteico destas estirpes se observa uma banda de 70-71,5 kDa quando se faz a

hibridação com o soro policlonal monoespecífico anti-LppB produzido em coelho. Este teste é, assim, também usado para confirmação da origem geográfica de uma determinada estirpe de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

- Por sequenciação de um fragmento de 5,6 kb da estirpe portuguesa B676P/93, a qual tinha evidenciado um perfil singular no que respeita ao padrão de hibridação com o elemento de inserção IS1296, confirmou-se o baixo conteúdo molar em G+C (25%). A tradução conceptual das ORF1L114 e ORF2R114, esta última parcial, identificadas no fragmento sequenciado, revelou que poderão corresponder a lipoproteínas de membrana com domínio transmembranar e péptido-sinal. Uma cópia da sequência de inserção IS1634, anteriormente descrita (Vilei *et al.*, 1999) foi caracterizada e revelou possuir 115 pb de repetições directas e uma transposase homóloga a outras transposases identificadas noutras cópias desta sequência na estirpe africana Afadé. É possível, assim, concluir que parece haver uma predominância de proteínas membranares no conjunto das proteínas celulares, o que está de acordo com as exigências nutricionais dos micoplasmas e as suas reduzidas dimensões genómicas e celulares. Futuramente, a expressão heteróloga, total ou parcial, da ORF1L114, que apresentou domínios transmembranares e hipotético péptido-sinal, assim como a produção de anticorpos policlonais, permitirão avaliar a sua especificidade em relação a *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC e a sua capacidade imunogénica. Estas características poderão ser úteis para o diagnóstico serológico da PPCB ou para o desenvolvimento de vacinas.
- A análise dos perfis de RNAs de baixo peso molecular (LMW-RNA), incluindo tRNAs, método desenvolvido e aplicado pela primeira vez à identificação e caracterização de espécies da Classe *Mollicutes*, permitiu diferenciar cinco membros dos seis pertencentes ao grupo "*Mycoplasma mycoides*". Esta nova abordagem confirmou resultados

anteriores de estudos filogenéticos baseados na comparação da sequência do gene de rRNA 16S, em que *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC apresentou 99,9% de similaridade com *M. mycoides* subsp. *capri*. Também pela análise dos perfis de tRNA se concluiu que estas duas espécies não são distinguíveis, devendo a sua classificação ser revista. Sugere-se a sua fusão com a subespécie *capri*. A estirpe B820/123, que apresentou uma micro-heterogeneidade relativamente às outras estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC analisadas, deverá ser também futuramente caracterizada em relação a aspectos morfológicos e bioquímicos. O isolamento e sequenciação da molécula de tRNA, com uma dimensão entre 85 e 115 nucleótidos, comum a *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e a *M. mycoides* subsp. *capri* e característica destas subespécies, ou a identificação e sequenciação do gene codificante, poderá oferecer boas perspectivas relativamente ao desenvolvimento de sondas ou sistemas de PCR que permitam identificá-las e diferenciá-las rapidamente.

**Tabela 6.1-** Avaliação sumária dos métodos utilizados para caracterizar estirpes do grupo "*Mycoplasma mycoides*"

Método	Nº de estirpes testadas	Tipo de Aplicação	Especificidade	Simplicidade de execução	Reprodutibilidade
Perfis de IS1296	107	Diferenciação entre estirpes africanas e europeias; estudos epidemiológicos em África	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Fácil, mas moroso	Alta
Baseado em PCR	99	Identificação de estirpes europeias ou africanas	Estirpes europeias ou africanas de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Fácil e rápido, mas exigindo controlos rigorosos	Alta
Imuno-deteção	15	Caracterização de estirpes africanas; detecção de bovinos infectados com estirpes africanas	Estirpes africanas de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Fácil e rápido, desde que standardizado	Média
Perfis de tRNA	37	Diferenciação e caracterização de espécies e subespécies	Espécies e subespécies do género <i>Mycoplasma</i> , nomeadamente dos membros do grupo " <i>Mycoplasma mycoides</i> "	Trabalhoso e demorado	Média

Os resultados obtidos demonstraram que os polimorfismos existentes podem ser utilizados para detecção e identificação específicas a diferentes

níveis taxonómicos. Globalmente, é possível proceder a uma análise comparativa dos diferentes métodos utilizados (Tabela 6.1) no que respeita a parâmetros importantes em sanidade animal.

No seu conjunto, os resultados aqui apresentados permitiram chegar às seguintes conclusões gerais relativamente às características moleculares de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC:

1. As estirpes portuguesas apresentam uma grande homogeneidade e estabilidade genómica, a avaliar pelos perfis da sequência de inserção IS1296 e de tRNA. A variação intraspecífica parece ser, portanto, baixa.
2. No fragmento de 5,6 kb da estirpe B676P/93 e nas regiões adjacentes a uma cópia do elemento IS1634 nele existente foram detectados genes que, eventualmente, codificam lipoproteínas de membrana e que poderão existir em *tandem*. Duas destas hipotéticas lipoproteínas (ORF1L114.pep e ORF2R114.pep) revelaram homologia com lipoproteínas de membrana de outros micoplasmas.
3. Foram detectadas 15 espécies de tRNA, das 29 referidas por outros autores, que correspondem aos anticodões mais comuns utilizados no género *Mycoplasma*. As características destas moléculas diferiram de subespécie para subespécie, a avaliar pelo perfil electroforético de tRNA diferente que cinco dos seis membros do grupo "*Mycoplasma mycoides*" apresentaram.

Com base neste trabalho, consideramos que será viável realizar estudos epidemiológicos mais detalhados, rápidos e rigorosos que conduzam a uma melhoria do diagnóstico da PPCB e a uma tentativa mais racional de a erradicar completamente.



## BIBLIOGRAFIA

- Abdo, E.-M., J. Nicolet, R. Miserez, R. Gonçalves, J. Regalla, C. Griot, A. Bensaïde, M. Krampe & J. Frey. 1998. Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet. Microbiol.* **59**: 109-122.
- Abdo, E.-M., J. Nicolet & J. Frey. 2000. Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LPPQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**: 588-595.
- Abu Groun, E. A., R. R. Taylor, H. Varsani, B. J. Wadher, R. H. Leach & R. Miles. 1994. Biochemical diversity within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Microbiology.* **140**: 2033-2042.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl (Eds.). 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates & Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York.
- Ballagi-Pordany, A. & S. Belak. 1996. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes* **10**: 159-164.
- Bascuñana, C. R., J. G. Mattsson, G. Bölske & K.-E. Johansson. 1994. Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. *J. Bacteriol.* **176**: 2577-2586.
- Bashiruddin, J.B., T. K. Taylor & A. R. Gould. 1994. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**: 428-434.
- Bashiruddin, J. B., R. A. J. Nicholas, F. G. Santini, R. A. Ready, M. J. Woodward & T. K. Taylor. 1994a. Use of the polymerase chain reaction to detect mycoplasma DNA in cattle with contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Rec.* **134**: 240-241.

- Bashiruddin, J. B., P. De Santis, A. Vacciana & F. G. Santini. 1999. Detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC in clinical material by rapid colorimetric PCR. *Mol. Cell. Probes* **13**: 23-28.
- Bashiruddin, J. B., F. G. Santini, P. De Santis, M. C. Visaggio, G. Di Francesco, A. D'Angelo & R. A. J. Nicholas. 1999a. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies. *mycoides* in tissues from an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia by culture, immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* **145**: 271-274.
- Belak, S. & A. Ballagi-Pordany. 1993. Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol. Cell. Probes* **7**: 241-248.
- Berg, D. E. & M. M. Howe (Eds.). 1989. *Mobile DNA*. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 972 p.
- Bhugra, B. & K. Dybvig. 1992. High-frequency rearrangements in the chromosome of *Mycoplasma pulmonis* correlate with phenotypic switching. *Mol. Microbiol.* **6**: 1149-1154.
- Bhugra, B. & K. Dybvig. 1993. Identification and characterization of IS1138, a transposable element from *Mycoplasma pulmonis* that belongs to the IS3 family. *Mol. Microbiol.* **7**: 577-584.
- Bidle, K. D. & M. Fletcher. 1995. Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 944-952.
- Birboim, H. C. & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Björk, G. R., J. U. Ericson, C. E. D. Gustafsson, T. G. Hagervall, Y. H. Jonsson & P. M. Wikstrom. 1987. tRNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 263-287.
- Botelho, A., E. Brandão, J. Bashiruddin, R. Nicholas, J. Regalla & A. Penha Gonçalves. 1994. Comparative study of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains isolated from bovine and small ruminants based on polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease profiles. *IOM Lett.* **3**: 52.

- Botelho, A. & J. Regalla. 1996. PCR *versus* conventional methods in the diagnosis of CBPP in Portugal. *In*: J. Frey & K. Sarris (Eds.), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, volume 1, European Commission, EUR 16934 EN, Luxembourg. pp. 69-71.
- Botelho, A., F. Thiaucourt, & J. Regalla. 1997. Sample preparation for PCR diagnosis of ruminants mycoplasmoses. First INTERCOST Meeting. Estoril. Portugal. p. 60 (Abstract).
- Botelho, A., J. Frey, J. Regalla & J. Nicolet. 1998. DNA fingerprinting of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates with the insertion element IS1296. *In*: G. Leori, F. Santini, E. Scanziani & J. Frey (Eds), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 2, European Commission, EUR 18018 EN, Luxembourg. pp. 148-151.
- Botelho, A., A. Prata, J. Bashiruddin & J. Regalla. 1999. Evaluation of colorimetric PCR for the diagnosis of CBPP. *In*: L. Stipkovits, R. Rosengarten & J. Frey (Eds.), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 3, European Commission, EUR 18756 EN, Luxembourg. pp. 166-169.
- Botelho, A., A. Prata & J. Regalla. 2000. Analyses of low-molecular-weight RNA profiles of members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *In*: D. Bergonier, X. Berthelot & J. Frey (Eds.), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, volume 4, European Commission, EUR 19245 EN, Luxembourg. pp. 135-138.
- Botelho, A., A. Prata & J. Regalla. 2001. Use of low molecular weight RNA profiles to characterise members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *In*: J. B. Poveda, A. Fernández, J. Frey & K.-E. Johansson (Eds.), COST Action 826. Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. Volume 5. European Commission, EUR 19693, Luxembourg. pp. 50-53.
- Brandão, E. 1995. Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains in sheep and goats. *Vet. Rec.* **28**: 98-99.

- Brenner, C., H. Wroblewski, M. Le Henaff, L. Montagnier & A. Blanchard. 1997. Spiraline, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces T-cell-independent B-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. *Infect. Immun.* **65**: 4322-4329.
- Brown, M. B., M. Ambrose. 1990. Caseinolytic activity of *M. m. mycoides*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Suppl.* **20**: 658-659.
- Chambaud, I., R. Heilig, S. Ferris, V. Barbe, D. Samson, F. Galisson, I. Moszer, K. Dybvig, H. Wroblewski, A. Viari, E.P. Rocha & A. Blanchard. 2001. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2145-53.
- Cheng, X., J. Nicolet, F. Poumarat, J. Regalla, F. Thiaucourt & J. Frey. 1995. Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology* **141**: 3221-3228.
- Cheng, X., J. Nicolet, R. Miserez, P. Kuhnert, M. Krampe, T. Pilloud, E.-M. Abdo, C. Griot & J. Frey. 1996. Characterization of the gene for an immunodominant 72 kDa lipoprotein of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Microbiology* **142**: 3515-3524.
- Citti, C., L. Maréchal-Drouard, C. Saillard, J. H. Weil & J. M. Bové. 1992. *Spiroplasma citri* UGG and UGA tryptophan codons: sequence of the two tryptophanyl-tRNAs and organization of the corresponding genes. *J. Bacteriol.* **174**: 6471-6478.
- Clark, B. F. C. 1979. Structure and function of tRNA. In: *Nonsense mutations and tRNA suppressors*. J. E. Celis & J.D. Smith Eds. pp 1-46. Academic Press. London.
- Clark, J., J. Frey & J. B. March. 2000. Strain typing and molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony by insertion sequence analysis. In: D. Bergonier, X. Berthelot & J. Frey (Eds.), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 4, European Commission, EUR 19245 EN, Luxembourg. pp. 163-166.
- Cottew, G. S. & F. R. Yeats. 1978. Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types. *Aust. Vet. J.* **54**: 293-296.

- Cottew, G. S., A. Breard, A. J. DaMassa, H. Ernő, R. H. Leach, P. C. Lefevre, A. W. Rodwell & G. R. Smith. 1987. Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr. J. Med. Sci.* **23**: 632-635.
- Collins-Thompson, D.L., P. J. Slade & M. Goethals. 1991. Use of low molecular mass RNA profiles to identify lactic acid bacteria and related organisms associated with foods. *Int. J. Food Microbiol.* **14**: 135-143.
- Costas, M., R. H. Leach & D. L. Mitchelmore. 1987. Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the "*Mycoplasma mycoides* cluster". *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3319-3329.
- Cruz-Sánchez, J. M., E. Velázquez, P. F. Mateos, E. Velázquez, & E. Martínez-Molina. 1997. Enhancement of resolution of low molecular weight RNA profiles by staircase electrophoresis. *Electrophoresis* **18**: 1909-1911.
- DaMassa, A. J., P. S. Wakenell & D. L. Brooks. 1992. Mycoplasmas of goats and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 101-113.
- Dedieu, L., V. Mady & P. C. Lefevre. 1994. Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet. Microbiol.* **42**: 327-339.
- Dirheimer, G., G. Keith, P. Dumas & E. Westhof. 1995. Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs. In: D. Söll & U. L. RajBhandary (Eds.) *tRNA Structure, biosynthesis and function*. ASM Press. Washington, D.C. pp. 93-126.
- Dybvig, K. & L. L. Voelker. 1996. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Vet. Microbiol.* **50**: 25-57.
- Edward, D. G. & E. A. Freundt. 1956. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 197-207.
- Egwu, G. E., R. A. J. Nicholas, J. A. Ameh & J. B. Bashiruddin. 1996. Contagious bovine pleuropneumonia: an update. *Vet. Bull.* **66**: 875-888.
- Ferreira, H. & M. M. Duarte. 1990. Electrophoretic and immunological profiles of mycoplasma strains isolated from lungs of bovine. In: J. Regalla (Ed.). *Contagious bovine pleuropneumonia*. Commission of European Communities, EUR 12065 EN, Luxembourg. pp. 80-86.

- Ferrell, R. V., M. B. Heidari, K. S. Wise & M. A. McIntosh. 1989. A *Mycoplasma* genetic element resembling prokaryotic insertion sequences. *Mol. Microbiol.* **3**: 957-967.
- Freundt, E. A. 1983. Culture media for classic mycoplasmas. *In: Methods in Mycoplasmaology* Volume I, pp. 127-135.
- Frazer, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton & J. M. Kelley. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.
- Frey, J., X. Cheng, P. Kuhnert & J. Nicolet. 1995. Identification and characterization of IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and presence in related mycoplasmas. *Gene* **160**: 95-100.
- Frey, J., X. Cheng, M.-P. Monnerat, E.-M. Abdo, M. Krawinkler, G. Bölske & J. Nicolet. 1998. *Res. Microbiol.* **149**: 55-64.
- Galas, D. J. & M. Chandler. 1989. Bacterial insertion sequences. *In: Berg, D. E. & M. M. Howe (Eds.). Mobile DNA*. American Society for Microbiol. Washington, D.C. pp. 109-162.
- Glass, J. L., E. J. Lefkowitz, J. S. Glass, C. R. Heiner, T. Nguyen, E. Y. Chen & G. H. Cassel. 1998. The *Ureaplasma urealyticum* genome. Abstracts of the 12th International Organisation for Mycoplasmaology Conference. Sydney, Australia. p. 148.
- Gonçalves, R., J. Regalla, J. Nicolet, J. B. Bashiruddin, P. De Santis & A. Penha-Gonçalves. 1996. A 98 kDa major antigenic band as a possible epidemiological marker differentiating European isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *In: J. Frey & K. Sarris (Eds.), COST Action 826. Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. European Commission, EUR 19693, Luxembourg. pp. 49-51.
- Gonçalves, R., J. Regalla, J. Nicolet, J. Frey, R. Nicholas, J. Bashiruddin, P. de Santis & A. P. Gonçalves. 1998. Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Vet. Microbiol.* **63**: 13-28.
- Hale, H. H., C. F. Helmboldt, W. N. Plastridge & E. F. Stula. 1962. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Corn. Vet. Med.* **52**: 582-591.

- Henikoff, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates target breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **8**: 351-359.
- Herbelin, A., E. Ruuth, D. Delorme, C. Michel Herbelin & F. Praz. 1994. *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Infect. Immun.* **62**: 4690-4694.
- Himmerreich, R. H., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B.- C. Li & R. Herrmann. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4420-4449.
- Höfle, M. 1988. Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Meth.* **8**: 235-248
- Höfle, M. 1990. Transfer RNAs as genotypic fingerprints of eubacteria. *Arc. Microbiol.* **153**: 299-304.
- Höfle, M. & I. Brettar. 1996. Genotyping of heterotrophic bacteria from the Central Baltic sea by use of low-molecular-weight RNA profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1383-1390.
- Holley, R. W., J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick & A. Zamir. 1965. Structure of a ribonucleic acid. *Science* **147**: 1462-1465.
- Hori, H., M. Sawada, S. Osawa, K. Murao, & H. Ishikura. 1981. The nucleotide sequence of 5S rRNA from *Mycoplasma capricolum*. *Nucleic Acids Res.* **9**: 5407-5410.
- Hotzel, H., K. Sachse & H. Pfützner. 1996. A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Vet. Microbiol.* **49**: 31-43.
- Houshamy, B. M., R. J. Miles & R. A. Nicholas. 1997. Oxidation of glycerol differentiates African from European isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (small colony). *Vet. Rec.* **140**: 182-183.
- Houshamy, B. M., R. J. Miles & R. A. Nicholas. 1998. Biochemical differentiation of European and African *Mycoplasma mycoides* SC (small colony) isolates. In: G. Leori, F. Santini, E. Scanziani & J. Frey (Eds.), COST Action 826. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics,*

- epidemiology and molecular genetics. Volume 2. European Commission, EUR 18018, Luxembourg. pp. 133-136.
- Hu, W. S., R. Y. Wang, R. S. Liou, J. W. Shih & S. C. Lo. 1990. Identification of an insertion-sequence-like genetic element in the newly recognized human pathogen *Mycoplasma incognitus*. *Gene* **93**: 67-72.
- International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. 1995. Revised minimum standards for description on the Taxonomy of Mollicutes (division *Tenericutes*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 605-612.
- Kahane, I. & A. Adoni (Eds). 1993. *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas*. Plenum Press. New York. 237 pp.
- Katsivela, E. & M. G. Höfle. 1995. Separation of transfer RNA and 5S ribosomal RNA using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. Anal.* **700**: 125-136.
- Kin, S. H., J. L. Sussman, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, A. H. Wang, N. C. Seeman & A. Rich. 1974. The general structure of transfer RNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 4970-4974.
- Kokotovic, B., P. Ahrens, N. F. Friis & J. S. Jensen. 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3300-3307.
- Kokotovic, B., G. Bölske, P. Ahrens & K.-E. Johansson. 2000. Genomic variations of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumonia* detected by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**: 63-68.
- ter Laak, E. A. 1992. Contagious bovine pleuropneumonia. A review. *Vet. Quart.* **14**: 104-110.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leach, R. H., H. Ernø & K. J. MacOwan. 1993. Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. Nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* to *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 603-605.



- Liébana, E., A. Aranaz, L. Dominguez, A. Mateos, O. González-Llamazares, E. E. Rodriguez-Ferri, M. Domingo, D. Vidal, D. Cousins. 1997. The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Vet. Microbiol.* **54**: 223-233.
- Lorenzon, S., A. David, M. Nadew, H. Wesonga & F. Thiaucourt. 2000. Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Mol. Cell. Probes* **14**: 205-210.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MacOwan, K. J. 1984. Role of mycoplasma strain F38 in contagious caprine pleuropneumonia. *Isr. J. Med. Sci.* **20**: 979-981.
- MacOwan, K. J. & J. E. Minette. 1976. A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod. J.* **8**: 91-95.
- Maniloff, J., R. N. McElhaney, L. R. Finch & J. B. Baseman (Eds.). 1992. *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 608 pp.
- Maniloff, J. 1992. Phylogeny of Mycoplasmas. In: J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, J. B. Baseman (Eds.). *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 549-559.
- March, J. B., P. Hitchen, H. R. Morris & A. Dell. 1999a). Analysis of the capsular polysaccharide of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, the causal agent of CBPP: purification, composition and its role in infection and immunity. In: L. Stipkovits, R. Rosengarten & J. Frey (Eds.), COST Action 826. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. Volume 3. European Commission, EUR 18756 EN, Luxembourg. pp. 69-72.
- March, J. B, G. E. Jones, H. S. Williamson & W. Amanfu. 1999b. Studies on the immunological diversity of type, vaccine and wild strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. In: L. Stipkovits, R. Rosengarten & J. Frey (Eds.), COST Action 826. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. Volume 3. European Commission, EUR 18756 EN, Luxembourg. pp. 159-162.

- March, J. B., J. Clarck & M. Brodlie. 2000. Characterization of strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type isolated from recent outbreaks of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana and Tanzania: evidence for a new biotype. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1419-1425.
- Marcone, C., H. Neimark, A. Ragazzoni, U. Lauer & E. Seemüller. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* **89**: 805-810.
- Miles, R. & R. Nicholas (Eds.). 1998. *Mycoplasmas Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 104. Totowa, New Jersey. Humana Press. 330 pp.
- Miserez, R., T. Pilloud, X. Cheng, J. Nicolet, C. Griot & J. Frey. 1997. Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Mol. Cell. Probes.* **11**: 103-111.
- Miserez, R., T. Pilloud, M. Krampe, C. Griot, L. Bruckner, J. Blum, A. Tontis, J. Frey & J. Nicolet. 1996. Experimental infections in cattle with a European and an African strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. In: J. Frey & K. Sarris (Eds.), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 1, European Commission, EUR 16934 EN, Luxembourg. pp. 147-149.
- Monnerat, M.-P., F. Thiaucourt, J. B. Poveda, J. Nicolet & J. Frey. 1999. Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**: 224-230.
- Mühlradt, P. F. & M. Frisch. 1994. Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor and interleukin-6. *Infect. Immun.* **62**: 3801-3807.
- Mullis, K. B. & F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. in Enzymol.* **155**: 335-350.
- Muto, A., Y. Andachi, H. Yuzawa, F. Yamao & S. Osawa. 1990. The organization and evolution of transfer RNA genes in *Mycoplasma capricolum*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5037-5043.
- Muto, A., Y. Andachi, F. Yamao, R. Tanaka & S. Osawa. 1992. Transcription and translation. In: Maniloff, J., R. N. McElhaney, L. R. Finch & J. B.

- Baseman (Eds.). 1992. *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 331-347.
- Nicholas, R. A. J., J. B. Bashiruddin, F. G. Santini, J. Regalla & T. K. Taylor. 1994. Evaluation of a polymerase chain reaction for contagious bovine pleuropneumonia in naturally infected cattle. *IOM Lett.* **3**: 15-16.
- Nicholas, R. A. J. & J. B. Bashiruddin. 1995. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (small colony variant): the agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the "*Mycoplasma mycoides* cluster". *J. Comp. Pathol.* **13**: 1-27.
- Nicholas, R. A.J., F. G. Santini, K. M. Clark, N. M. A. Palmer, P. De Santis & J. B. Bashiruddin. 1996. A comparison of serological tests and gross lung pathology for detecting contagious bovine pleuropneumonia in two groups of Italian cattle. *Vet. Rec.* **139**: 89-93.
- Nicholas, R. A. J. & S. Baker. 1998. Recovery of mycoplasmas from animals. In: R. J. Miles & R. A. J. Nicholas (Eds.). *Mycoplasmas Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 104. Totowa, New Jersey. Humana Press. pp: 37-44.
- Nicholas, R., J. Bashiruddin, R. Ayling & R. Miles. 2000. Contagious bovine pleuropneumonia: a review of recent developments. *Vet. Bull.* **70**: 827-838.
- Nocard, E. & E. R. Roux. 1898. Le microbe de la peripneumonie. *Ann. Institut Pasteur* **12**: 240-262.
- Ohtsubo, E. & Y. Sekine. 1996. Bacterial Insertion Sequences. In: Saedler, H. & A. Gierl (Eds.). *Transposable Elements. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 204. Berlin. Springer. pp. 1-26.
- Pearson, W. R. & D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Persson, A., B. Pettersson, G. Bölske & K.-E. Johansson. 1999. Diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia by PCR-laser-induced fluorescence and PCR-restriction endonuclease analysis based on the 16S rRNA genes of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3815-3821.
- Pettersson, B., T. Leitner, M. Ronaghi, G. Bölske, M. Uhlén, & K.-E. Johansson. 1996. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by

- sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J. Bacteriol.* **178**: 4131-4142.
- Poumarat, F., D. Longchambon & J. L. Martel. 1992. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within "*M. mycoides* cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* **32**: 375-390.
- Poumarat, F & M. Salsona. 1994. Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype "Small Colony" (*M.m.m.* SC). *IOM Lett.* **3**: 23 (Abstract).
- Poumarat, F & M. Salsona. 1995. Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype small colony, the agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **47**: 305-321.
- Provost, A ., P. Perreau, A . Bréard, C. Le Goff, J. L. Matel & G. S. Cottew. 1987. Contagious bovine pleuropneumonia. *Rev Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **6**: 625-679.
- Rawadi, G. & S. Roman-Roman. 1996. Mycoplasma membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **64**: 637-643.
- Razin, S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.* **42**: 414-470.
- Razin, S. 1992. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, J. B. Baseman (Eds.). *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 3-22.
- Razin, S., D. Yogev & Y. Naot. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1094-1156.
- Regalla, J. 1984. Epidemiological aspects of the contagious bovine pleuropneumonia in Portugal. *Rep. Trab. LNIV.* **XVI**: 13-18.
- Regalla, J. 1985. La réaction de fixation du complément pour le diagnostic sérologique de la péripneumonie contagieuse bovine: application et interprétation des résultats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **14**: 631-644.
- Regalla, J., V. Caporale, A. Giovanni, F. Santini, J. L. Martel & A. Penha-Gonçalves. 1996. Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **15**: 1309-1325.

- Rice, P., B. M. Houshaymi, E. A. Abu-Groun, R. A. Nicholas & R. J. Miles. 2001. Rapid screening of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Mycoplasma mycoides* and differentiation of European subsp. *mycoides* SC (small colony) isolates. *Vet. Microbiol.* **78**: 343-351.
- Rodriguez, J. L., R. W. Ermel, T. P. Kenny, D. L. Brooks & A. J. DaMassa. 1997. Polymerase chain reaction and endonuclease digestion for selected members of the "*Mycoplasma mycoides* cluster" and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**: 186-190.
- Ross, R. F. 1993. Mycoplasma – animal pathogens. In: I. Kahane & A. Adoni (Eds.). *Rapid diagnosis of mycoplasmas*. Plenum Press. New York, pp. 69-109.
- Rurangirwa, F. R., P. S. Shompole, A. N. Wambugu & T. C. McGuire. 2000. Monoclonal antibody differentiation of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony causing contagious bovine pleuropneumonia from less important large-colony strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**: 519-521.
- Saedler, H. & A. Gierl (Eds.). 1996. *Transposable Elements. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Volume 204. Berlin. Springer. 234 pp.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich & N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Salih, M. M., H. Ernø, V. Simonsen. 1983. Electrophoretic analysis of isoenzymes of *Mycoplasma* species. *Act. Vet. Scand.* **24**: 14-23.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Samuelsson, T. & T. Borén. 1992. Evolution of macromolecule synthesis. In: J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch & J. B. Baseman. (Eds.). *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp.575-591.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

- Santos, M., C. El-Adlouni, A. Cox, J. Luz, G. Keith, & M. Tuite. 1994. Transfer RNA profiling: a new method for the identification of pathogenic *Candida* species. *Yeast* **10**: 625-636.
- Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P.A.M. Segers & J. Frey. 1999. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumonia*. *Microbiology* **145**: 2105-2116.
- Schwartz, D. C. & C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75.
- Simecka, J. W., J. K. Davis, M. K. Davidson, S. E. Ross, C. T. K. H. Städtlander & G. H. Cassel. 1992. Mycoplasma Diseases of Animals. In: J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, J. B. Baseman (Eds.). *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 391-415.
- Slade, P. J. & D. L. Collins-Thompson. 1991. Differentiation of the genus *Listeria* from other Gram-positive species based on low molecular weight (LMW) RNA profiles. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 355-360.
- Söll, D. & U. L. RajBhandary (Eds). 1995. *tRNA Structure, Biosynthesis, and Function*. ASM Press. Washington, D.C. 572 pp.
- Sprinzl, M., T. Hartmann, J. Weber, J. Blank & R. Zeidler. 1989. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **17** Supplement: r1-r67.
- Stradaioli, G. L. Sylla, F. Mazzarelli, R. Zelli, G. Rawadi & M. Monaci. 1999. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC identification by PCR in sperm of seminal vesiculitis-affected bulls. *Vet. Res.* **30**: 457-466.
- Studier, W. F. & B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn & J. W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct the expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.

- Taylor, T. K., J. B. Bashiruddin & A. R. Gould. 1992. Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 593-601.
- Thiaucourt, F., S. Lorenzon, A. David & A. Breard. 2000. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet. Microbiol.* **72**: 251-268.
- Towbin, S. T., T. Staehelin & J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Tully, J. G., J. M. Bové, F. Laigret & R. F. Whitcomb. 1993. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with onhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 378-385.
- Ushida, C. & A. Muto. 1993. Small stable RNAs in *Mycoplasma capricolum*. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **29**: 157-158.
- Ushida, C. & A. Muto. 1995. Novel small stable RNAs of *Mycoplasma capricolum*. *DNA Res.* **2**: 229-230.
- Ushida, C., S. Sasamura & A. Muto. 1997. Probing the secondary structure of MCS4 RNA of *Mycoplasma capricolum*. *J. Biochem.* **122**: 1202-1207.
- Vacciana, A., P. de Santis, F. G. Santini & J. B. Bashiruddin. 1998. Colorimetric PCR in the diagnosis of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. In: G. Leory, F. Santini, E. Scanziani & J. Frey (Eds.), COST Action 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics, Volume 2, European Commission, EUR 18018 EN, Luxembourg. pp. 125-127.
- Velázquez, E., J. Cruz-Sánchez, P. Mateos, & E. Martínez-Molina. 1998. Analysis of stable low-molecular-weight RNA profiles of members of the family *Rhizobiaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1555-1559.

- Velázquez, E., O. Calvo, E. Cervantes, P. F. Mateos, M. Tamame & E. Martínez-Molina. 2000. Staircase electrophoresis profiles of stable low-molecular-weight RNA – a new technique for yeast fingerprinting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 917-923.
- Vilei, E. M., J. Nicolet & J. Frey. 1999. IS1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. *J. Bacteriol.* **181**: 1319-1323.
- Vilei, E. M., E.-M. Abdo, J. Nicolet, A. Botelho, R. Gonçalves & J. Frey. 2000. Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology* **146**: 477-486.
- Vilei, E. & J. Frey. 2001. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* **8**: 85-92.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- Woese, C. R., O. Kandler & M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.